



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**SCREENING BIOTECHNOLOGICKÉHO POTENCIÁLU
VYBRANÝCH ZÁSTUPCŮ RODU GEOBACILLUS A
DALŠÍCH PŘÍBUZNÝCH RODŮ**

SCREENING OF BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF SELECTED MEMBERS OF THE GENUS
GEOBACILLUS AND OTHER RELATED GENUSES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Xenie Kouřilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1304/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Xenie Kouřilová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Screening biotechnologického potenciálu vybraných zástupců rodu *Geobacillus* a dalších příbuzných rodů

Zadání diplomové práce:

1. Charakterizace rodu *Geobacillus* na základě literární rešerše
2. Základní metabolická charakterizace vybraných zástupců rodu *Geobacillus* a vybraných zástupců příbuzných rodů
2. Experimentálně ověřit potenciál pro produkci PHA, biosurfaktantů, organických kyselin, antimikrobiálních látek a dalších biotechnologicky relevantních metabolitů

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Xenie Kouřilová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá screeningem biotechnologického potenciálu vybraných termofilních zástupců rodu *Geobacillus*, *Saccharococcus* a *Bacillus*, přičemž bakterie z prvních dvou zmíněných rodů pocházely z české a německé sbírky mikroorganismů a bakterie rodu *Bacillus* byly přírodní izoláty. U zkoumaných kmenů byla zjišťována schopnost utilizace uhlíkatých zdrojů. Dále byla testována produkce biosurfaktantů, extracelulárních hydrolytických enzymů (proteázy, amylázy, lipázy, celulázy a xylanázy), organických kyselin, antimikrobiálních látek a mikrobiálních plastů – polyhydroxyalkanoátů. Bakterie *S. thermophilus*, *G. uzenensis* a *G. zalihae* vykazovaly významnou schopnost produkce biosurfaktantů. Kmeny *G. jurassicus*, *G. uzenensis*, *G. gargensis* a *G. lituanicus* byly schopny intenzivní produkce všech testovaných technologicky významných enzymů. Nejvyšších antimikrobiálních účinků dosahovaly bakterie *G. stearothermophilus* a *G. thermocatenulatus*. Nejvyšší produkce kyseliny octové bylo dosaženo u *G. jurassicus* a kyseliny mléčné u *G. thermodenitrificans*. Schopnost produkce polyhydroxyalkanoátů byla na úrovni genotypu prokázána pouze některými kulturami, ovšem na úrovni fenotypu byla odezva negativní. Naopak bakterie rodu *Bacillus* byly schopny produkovat polyhydroxyalkanoáty, i když za daných podmínek pouze v malé míře. U zbylých zkoumaných metabolitů byla schopnost produkce ve srovnání s rody *Geobacillus* a *Saccharococcus* výrazně nižší.

KLÍČOVÁ SLOVA

Termofilní mikroorganismy, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Saccharococcus*, screening, biosurfaktanty, PHA, organické kyseliny, antimikrobiální látky, hydrolytické enzymy

ABSTRACT

This diploma thesis deals with selected thermophilic representatives of genera *Geobacillus*, *Saccharococcus* and *Bacillus*, taking screening of its biotechnological potential into account. Bacteria from the first two genera came from Czech and German collection of microorganisms, while bacteria of genus *Bacillus* were natural isolates. Researched strains were examined from a viewpoint of carbon source utilization and furthermore, production of biosurfactants, extracellular hydrolytic enzymes (protease, amylase, lipase, cellulase, xylanase), organic acids, antimicrobial agents and microbial plastics – polyhydroxyalkanoates was also tested. Bacteria *S. thermophilus*, *G. uzenensis* and *G. zalihae* evinced a substantial ability of biosurfactant production. Strains *G. jurassicus*, *G. uzenensis*, *G. gargensis* and *G. lituanicus* were capable of intensive production of all tested, technologically significant enzymes. Highest antimicrobial effects were reached with bacteria *G. stearothermophilus* and *G. thermocatenulatus*. Largest production of acetic acid was achieved with *G. jurassicus* and lactic acid with *G. thermodenitrificans*. Ability to produce polyhydroxyalkanoates was proved at genotype level by some cultures only, however at fenotype level, response was negative. On the contrary, bacteria genus *Bacillus* were able to produce polyhydroxyalkanoates, although in small amounts under given circumstances. With remaining researched metabolites, production ability was considerably lower, compared to genera *Geobacillus* and *Saccharococcus*.

KEY WORDS

Thermophilic microorganisms, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Saccharococcus*, screening, biosurfactants, PHA, organic acids, antimicrobial agents, hydrolytic enzymes

Bibliografická citace

KOUŘILOVÁ, X. *Screening biotechnologického potenciálu vybraných zástupců rodu Geobacillus a dalších příbuzných rodů*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113531>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení, neutuchající optimismus, cenné podněty a připomínky. Chtěla bych také poděkovat konzultantce Ing. Ivě Pernicové za trpělivost a ochotu řešit vše, co by mohlo být překážkou při vzniku práce.

Velké poděkování patří především rodině a také přátelům za morální i materiální podporu.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Extremofilní mikroorganismy.....	9
2.2	Biotechnologický potenciál	10
2.3	Termofilní mikroorganismy.....	11
2.3.1	Adaptace na podmínky	11
2.3.2	Využití	11
2.3.3	Rod <i>Bacillus</i>	12
2.3.4	Rod <i>Geobacillus</i>	12
2.3.5	Rod <i>Saccharococcus</i>	14
2.4	Významné metabolity	14
2.4.1	Polyhydroxyalkanoáty	14
2.4.1.1	Biosyntéza.....	15
2.4.1.2	Využití.....	16
2.4.2	Biosurfaktanty	16
2.4.2.1	Syntéza.....	17
2.4.2.2	Využití.....	17
2.4.3	Organické kyseliny	18
2.4.4	Antimikrobiální látky	18
2.4.5	Hydrolytické enzymy	19
3	Experimentální část.....	21
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje.....	21
3.1.1	Použité mikroorganismy.....	21
3.1.2	Použité chemikálie.....	22
3.1.2.1	Chemikálie pro kultivaci.....	22
3.1.2.2	Chemikálie pro screening uhlíkatých zdrojů	22
3.1.2.3	Chemikálie pro screening enzymů.....	23
3.1.2.4	Chemikálie pro analýzu biosurfaktantů	23
3.1.2.5	Chemikálie pro screening antimikrobiálních látek	23
3.1.2.6	Komponenty pro PCR, izolaci DNA a elektroforézu na agarózovém gelu	
	23	
3.1.3	Použité přístroje.....	24

3.2	Kultivace mikroorganismů.....	24
3.2.1	Inokulační média	25
3.2.2	Produkční média	26
3.3	Stanovení obsahu biomasy.....	29
3.4	Screening utilizace uhlíkatých zdrojů	29
3.5	Screening produkce biosurfaktantů.....	30
3.5.1	Solubilizace krystalického anthracenu (Solubilization of crystalline)	30
3.5.2	Stanovení emulgační aktivity (Emulsification capacity assay)	31
3.5.3	Metoda du-Noüy-Ring.....	31
3.6	Screening produkce enzymů	31
3.7	Stanovení organických kyselin	32
3.8	Stanovení antimikrobiální aktivity.....	32
3.9	Analýza produkce polyhydroxyalkanoátů	32
3.9.1	Identifikace PHA pomocí molekulárně biologické techniky	32
3.9.2	Analýza PHA pomocí plynové chromatografie.....	33
4	Výsledky a diskuze.....	35
4.1	Screening biotechnologického potenciálu sbírkových kmenů rodu <i>Geobacillus</i> a <i>Saccharococcus</i>	35
4.1.1	Kultivační média.....	35
4.1.2	Schopnost utilizace uhlíkatých zdrojů	36
4.1.3	Screening produkce biosurfaktantů	40
4.1.4	Screening produkce hydrolytických enzymů	43
4.1.5	Screening produkce organických kyselin	45
4.1.6	Stanovení antimikrobiální aktivity	49
4.1.7	Screening produkce polyhydroxyalkanoátů	50
4.2	Screening biotechnologického potenciálu přírodních izolátů rodu <i>Bacillus</i>	51
4.2.1	Schopnost utilizace uhlíkatých zdrojů	51
4.2.2	Screening produkce biosurfaktantů	53
4.2.3	Screening produkce hydrolytických enzymů	54
4.2.4	Screening produkce organických kyselin	55
4.2.5	Stanovení antimikrobiální aktivity	56
4.2.6	Screening produkce polyhydroxyalkanoátů	56
5	Závěr.....	57
6	Seznam použitých zdrojů	59

1 ÚVOD

Extremofilní mikroorganismy představují jedny z nejvíce fascinujících organismů na Zemi, jelikož jsou schopny obývat extrémní prostředí charakterizované fyzikálními či chemickými vlastnostmi, které jsou naprosto nepřátelské pro většinu ostatních organismů. Termín „extremofil“ poprvé použil v roce 1974 R. D. MacElroy v práci nazvané „Some comments on the evolution of extremophiles“. Za extremofily jsou považovány takové organismy, jejichž metabolismus byl na extrémní podmínky adaptován. Mikroorganismus tedy v takových podmínkách pouze nepřežívá, ale prospívá [1].

Termofilní mikroorganismy tvoří podskupinu extremofilních organismů. Vyznačují se růstem při teplotním optimu od 50 °C. Biotechnologický zájem získaly nejen díky produkci termostabilních látek, především enzymů, ale také díky uplatnění v odpadovém hospodářství. Nicméně v posledních několika málo letech se začíná o termofilních mikroorganismech uvažovat také jako o produkčních kulturách, protože vyšší kultivační teploty umožňují dosažení vyšší reakční rychlosti, vyšší rozpustnosti většiny chemikálií či snížení nároků na sterilitu prostředí. Další neméně důležitou roli hrají termofilní bakterie v biotechnologickém procesu při snižování nákladů [2].

Rody *Geobacillus*, *Saccharococcus* a několik zástupců rodu *Bacillus* jsou součástí termofilních mikroorganismů. Jedná se o gram-pozitivní bakterie vykazující příbuznost. Rody *Geobacillus* a *Saccharococcus* byly dlouhou dobu součástí rodu *Bacillus*. Teprve nedávno došlo k jejich taxonomickému vyčlenění. Jejich biotechnologické využití je stále předmětem výzkumu [3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Extremofilní mikroorganismy

Extremofily jsou mikroorganismy, které dokáží žít a reprodukovat se v „drsných“ podmínkách, ve kterých by jiné organismy nepřežily. Tato skupina mikroorganismů je taxonomicky velice rozšířená a také funkčně různorodá. Pokud jsou tyto mikroorganismy schopny akceptovat více extrémních podmínek, nazývají se polyextremofily. Extrémní podmínky mohou být rozděleny do tří skupin – fyzikální, geochemické a biologické. Mezi fyzikální se řadí například tlak, radiace, či teplota, mezi geochemické salinita, pH, redoxní potenciál a k biologickým, například nutriční extrém. Dle prostředí jsou extremofily klasifikovány do několika skupin viz tabulka 1 [4-6].

Tabulka 1: Klasifikace a příklad extremofilů [5]

parametr prostředí	označení	optimum	příklad mikroorganismu
teplota	hypertermofily	>80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i>
	termofily	50-80 °C	<i>Synechococcus lividis</i>
	psychrofilny	<15 °C	<i>Psychrobacter</i>
radiace			<i>Deinococcus radiodurans</i>
tlak	piezofily/ barofily	> 0,1 MPa	<i>Shewanella benthica</i>
vysušení	xerofily	bezvodé	<i>Artemia salina</i>
salinita	halofily	2-5 M NaCl	<i>Dunaliella salina</i>
pH	alkalofily	> 9	<i>Spirulina</i> spp. (pH 10,5)
	acidofily	< 2-3	<i>Ferropasma</i> sp. (pH 0)
chemické extrémy	plyny	čistý CO ₂	<i>C. caldarium</i>
	kovy	metalotolerantní (Zn, Co, Cd, Hg, Pb)	<i>Ferropasma acidarmanus</i>

Extremofily se vyvíjely tak, aby byly schopny se přizpůsobit těžkým geologickým podmínkám. Jejich přizpůsobení nelze zdůvodňovat pouze jako reakci na stres, jelikož v náročných podmínkách nejen přežívají, ale i prosperují. Lze to dokázat také složitostí adaptace molekulárního mechanismu. Podle klasifikační domény 16S rRNA se archea dělí do čtyř království – *Crenarchaeota*, kam náleží termofily a psychrofilny, *Euryarchaeota*, která

zahrnují hypertermofily a halofily, *Korarchaeota*, kam se řadí hypertermofilní archea a *Nanoarchaeota*, která jsou zastoupena pouze jedním druhem, a to *Nanoarchaeum equitans*. Výzkum extremofilů se zintenzivnil poté, co byla publikována první genomová sekvence methanogenního archeonu *Methanococcus jannaschii* v roce 1996 [7-10].

2.2 Biotechnologický potenciál

Přestože se v současné době průmyslově využívá jen několik druhů extremofilů, díky svým jedinečným enzymatickým a fyziologickým vlastnostem mají velký biotechnologický potenciál. Jednou z výhod extrémních mikroorganismů je využití jejich enzymů tzv. extremozymů a jiných biomolekul – extremolytů, které jsou i v drastických podmínkách stabilní (Tabulka 2).

Extremofilní mikroorganismy využívají extremolyty k přežití. Tyto látky mohou být mikroorganismy syntetizovány de novo nebo je mohou v buňkách akumulovat „vychytáváním“ z prostředí. Aplikace extremolytů je značná, zejména ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Tyto biomolekuly, jako jsou hydroxyektoiny, snižují vysoce toxické vedlejší účinky imunotoxinů [4, 11].

Tabulka 2: Hlavní příklady enzymů a biomolekul izolovaných z extremofilů a jejich použití [4]

mikroorganismy	enzymy a ostatní biomolekuly	aplikace a produkty
termofily (50-110 °C)	amylázy, glykosidázy	zpracování škrobu, glukóza, fruktóza, trehalóza, laktóza, sacharificační enzymy, syntéza oligosacharidů
	lipázy	zpracování odpadních vod, detergenty
	xylanázy	bělení papírů
	proteázy	zpracování potravin, detergenty, výroba aminokyselin
	DNA polymerázy	genové inženýrství
psychrofily (0-20 °C)	amylázy, proteázy, lipázy	polymerní degradační činidla v detergentech
	dehydrogenázy	biosenzory
alkalofily pH≥9	celulázy, proteázy	polymerní degradační činidla v detergentech
	amylázy, lipázy	aditiva v potravinách
	cyklodextriny	
halofily 3-20 % soli	kompatibilní roztoky	farmaceutika
	membrány	kosmetická aditiva

Potenciál extremozymů je značný v širokém množství odvětví, jako například zemědělství, potravinářství, farmacii, při výrobě detergentů, v textilním průmyslu, papírenství a biomedicině. Kromě extremozymů jsou dalšími významnými metabolity exopolysacharidy, biosurfaktanty a biopolymery. Například biosurfaktanty mohou nahradit chemicky vyráběné povrchově aktivní látky v herbicidních a pesticidních přípravcích zvyšujících bioremediaci půd [12].

2.3 Termofilní mikroorganismy

Termofilní mikroorganismy nacházejí své teplotní optimum pro růst od 50 °C výše. V přirozeném prostředí se vyskytují v geotermálně vyhřívaných oblastech Země, jako jsou horké prameny, gejzíry, v prostředí spojeném s vysokou vulkanickou aktivitou, hlubokomořské hydrotermální průduchy a rozkládající se živá hmota. Suchozemské horké prameny se nacházejí ve většině geotermálních oblastí ve Spojených státech amerických, na Islandu, Novém Zélandu, v Japonsku, Indii, Itálii, Indonésii, Rusku a ve střední Africe. Slibným zdrojem je také prostředí s vysokou teplotou vytvořené člověkem. Zde se řadí komposty a siláže, které jsou schopny dosáhnout teplot od 60 do 65 °C, aktivované kaly, nebo také průmyslové chladicí vody [4, 10].

Termofilní mikroorganismy patří do dvou fylogeneticky odlišných domén – *Bacteria* a *Archaea*. Termofilní prokaryota byla rozdělena do několika kategorií dle optimální teploty – fakultativní termofil (pod 45 °C, teplotní optimum je na hranici s mezofilními bakteriemi), termotolerant (45 °C, schopný růst i nad optimální teplotu), mírný termofil (45-60 °C), striktní termofil (60-80 °C) a hypertermofil (nad 80 °C) [5, 14, 15].

2.3.1 Adaptace na podmínky

Buněčné složky, mezi které se řadí lipidy, nukleové kyseliny a proteiny, jsou velmi citlivé na teplo. Z tohoto důvodu je nezbytná termofilní adaptace, která je při zvýšených teplotách realizována příspěvky z mnoha různých fyzikálně-chemických faktorů. K přežití vysokých teplot termofilům napomáhá produkce kompatibilních látek, jako je diinositolfosfát, diglycerolfosfát a manosylglycerát, které chrání proteiny před denaturací. Nejen enzymy, ale také cytoplazmatická membrána se přizpůsobila vysoké teplotě. Dále k termostabilitě přispívá vysoký obsah guaninu a cysteinu v genomu, poměr nabitých a nenabitých aminokyselin, zvýšení iontových interakcí a vodíkových vazeb, koordinace kovů a kompaktnost jejich proteinů a preference určitých aminokyselin. Například u *Geobacillus stearothermophilus* bylo pozorováno upřednostnění glycinu před izoleucinem a alaninu před tyrosinem. Posttranslační modifikace a složení bílkovin pomocí chaperonů jsou dalšími rysy termostabilizace. U hypertermofilních mikroorganismů byly objeveny membránové lipidy obsahující glycerol-etherové lipidy, které zvyšují stabilitu membrán, na rozdíl od mezofilních buněk obsahujících ester-lipidy [16, 17].

2.3.2 Využití

Termofilní mikroorganismy jsou hojně využívány v průmyslu. V potravinářství je možné se s nimi setkat při výrobě termofilní jogurtové kultury, sýrařské zákysové kultury nebo pro produkci kyseliny mléčné. Za tímto účelem jsou využívány bakterie *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* [18].

Dalším významným uplatněním termofilních kultur je aplikace v odpadovém hospodářství. Používají se v procesech čištění odpadních vod. Jednou z forem je aktivovaný kal, kde dochází k rozkladu organických rozpuštěných látek. Dále se termofily používají při první fázi kompostování, kde dochází k nárůstu teploty až na 60 °C. Mikroorganismy rozkládají složité organické látky na jednodušší anorganické sloučeniny [13].

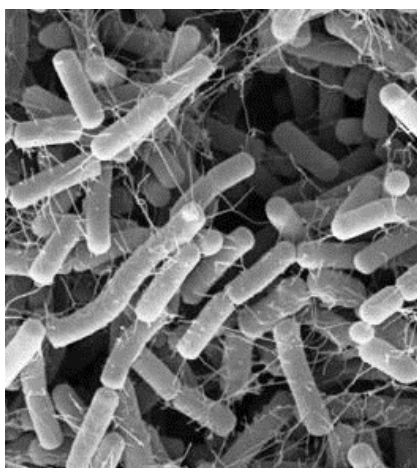
Velmi významným využitím je produkce termostabilních enzymů. Vzhledem k jejich stabilitě při vysokých teplotách se uplatňují v několika průmyslových odvětvích (Tabulka 2) [4].

2.3.3 Rod *Bacillus*

Buňky rodu *Bacillus* mají tvar tyčinek se zaoblenými či hranatými konci, viz obrázek 1. Vyskytují se ve dvojicích nebo v řetízích. Rod *Bacillus* sestává z více než 60 zástupců. Jedná se o aerobní či fakultativně anaerobní, gram-pozitivní bakterie. Vykazují rozmanité fyziologické vlastnosti (pH, teplota, salinita). Optimum pro růst bakterií je široké v rozmezí 15 až 55 °C. Například vegetativní buňky *Bacillus licheniformis* mají vhodné podmínky pro růst při 56 °C. Bakterie jsou schopny produkovat endospory. Tvar endospor a mateřských buněk je příznačný pro taxonomické rozdělení bakterií rodu *Bacillus* do tří morfologických skupin:

1. endospory mající oválný tvar, neztlušťující mateřskou buňku (*B. subtilis*)
2. endospory mající oválný tvar, ztlušťující mateřskou buňku (*B. licheniformis*)
3. endospory mající kulatý tvar, vždy ztlušťující mateřskou buňku. (*B. pasteurii*)

Právě z druhé morfologické skupiny se začala část zástupců v roce 2001 řadit mezi rod *Geobacillus* [19].



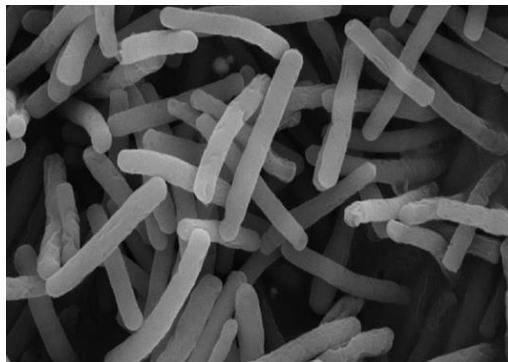
Obrázek 1: *Bacillus amyloliquefaciens* [20]

Rod *Bacillus* je široce využíván pro průmyslové fermentace. Často používané jsou druhy *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. alkalophilus* a *B. thuringiensis*. Jsou obecně považovány za bezpečné (GRAS), tedy je možné je využívat v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Pomocí těchto bakterií jsou produkovány enzymy a antibiotika. Bakterie *Bacillus licheniformis* jsou používány v průmyslové fermentaci k výrobě amyláz. Také jsou atraktivním hostitelem pro expresi klonovaných genových produktů [21, 22].

2.3.4 Rod *Geobacillus*

Rod *Geobacillus* zastupuje více než 25 druhů grampozitivních bakterií. Do roku 2001 byly zahrnovány do rodu *Bacillus*. Na základě mnoha důkazů podpořených analýzou 16S rRNA došlo k jejich rekvifikaci jako samostatný rod *Geobacillus*, jehož hlavním představitelem je *Geobacillus stearothermophilus*. Jedná se o aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinky (Obrázek 2) tvořící endospory. Jejich teplotní optimum se pohybuje v závislosti na použitém

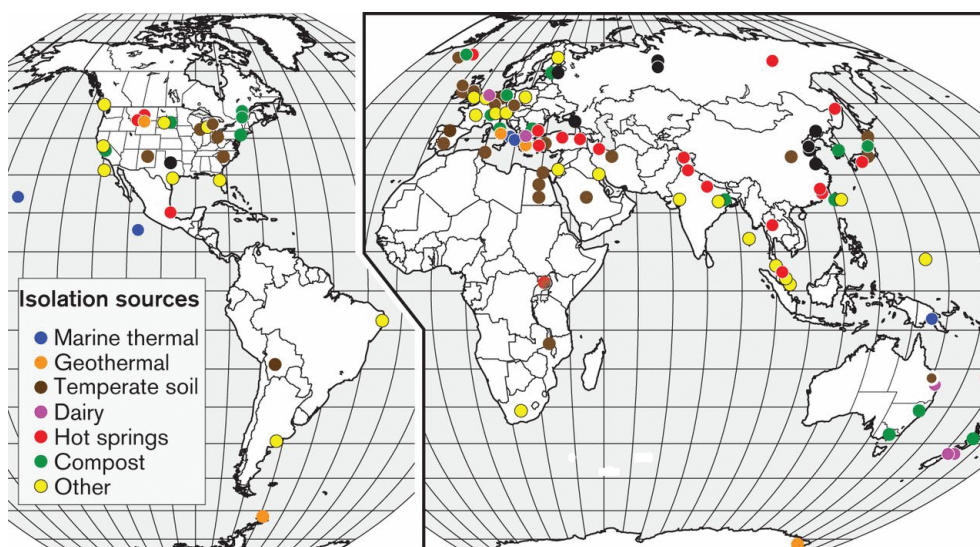
kmenu. Minimální růstovou teplotu je možné nalézt již při 35 °C. Naopak maximální hodnoty se pohybují až kolem 80 °C. Ovšem pro většinu zástupců je vhodný teplotní rozsah v rozmezí 45 až 70 °C. Zástupci rodu *Geobacillus* jsou schopni fermentovat jak hexóзовé, tak pentóзовé cukry a oligomery za účelem produkce laktátu, formiátu, acetátu a ethanolu jako produktů [3, 23].



Obrázek 2: *Geobacillus thermodenitrificans*, elektronový mikroskop (SEM) [24]

Díky těmto vlastnostem jsou bakterie *Geobacillus* zdrojem termostabilních enzymů využívaných v biotechnologickém průmyslu. Dále mohou být platformami pro výrobu biopaliv. Také mají potenciál jako komponenty bioremediačních procesů [25-27].

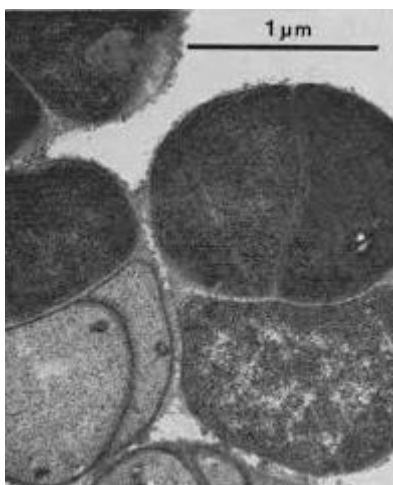
Výskyt rodu *Geobacillus* je mnohem rozsáhlejší, než by se dalo předpokládat. Jak znázorňuje obrázek 3, je možné tyto bakterie detekovat téměř všude na světě. Je možné pozorovat, že bakterie rodu *Geobacillus* byly izolovány jak na všech sedmi kontinentech, tak i v Tichém oceánu a Středozemním moři. Díky molekulárním metodám byl zjištěn pravděpodobný výskyt tohoto rodu také v horní troposféře, tedy přibližně 10 000 m nad zemským povrchem. Kmeny rodu *Geobacillus* byly objeveny také pod úrovní zemského povrchu, například v ropných vrtech, zlatých dolech a sedimentech kontinentálních šelfů [28-32].



Obrázek 3: Geografické rozložení míst, odkud byly izolovány bakterie rodu *Geobacillus* [29]

2.3.5 Rod *Saccharococcus*

Bakterie rodu *Saccharococcus* se řadí mezi gram-pozitivní, aerobní, heterotrofní, termofilní koky, viz obrázek 4, které netvoří spory. Jediným známým zástupcem tohoto rodu je *Saccharococcus thermophilus*. Dříve uváděný druh *Saccharococcus caldoxylosilyticus* byl překlasifikován a od roku 2001 je nazýván jako *Geobacillus caldoxylosilyticus*. *S. thermophilus* byl objeven a izolován v cukerném extraktu z cukrové řepy. Jaké je přirozené prostředí pro tyto bakterie zatím nebylo objeveno [19, 33, 34].



Obrázek 4: *Saccharococcus thermophilus* [33]

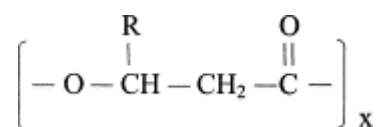
2.4 Významné metabolity

Bakterie rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus* produkují množství metabolitů využitelných v různých odvětví průmyslu. Těmito produkty jsou například biosurfaktanty, polyhydroxyalkanoáty, termostabilní hydrolytické enzymy, organické kyseliny a látky s antimikrobiálním účinkem.

2.4.1 Polyhydroxyalkanoáty

Kumulace petrochemického plastového odpadu v prostředí je neustále větší problém. Z tohoto důvodu se hledají alternativní materiály na výrobu plastů. Jednou z těchto alternativ jsou právě polyhydroxyalkanoáty (PHA), které jsou biologicky odbouratelné a ekologicky nezávadné. Tyto biokompatibilní termoplasty vykazují vlastnosti podobné polypropylenu. Jedná se o ve vodě nerozpustné polymery. Jsou produkovány různými druhy bakterií, které je hromadí ve formě intracelulárních granulí. PHA jsou buňkou syntetizovány jako energie a uhlíková rezerva. Neustále se provádí výzkumy zaměřené na hledání a využívání alternativních substrátů, nových extrakčních metod, geneticky vylepšených druhů a smíšených kultur, aby byly PHA komerčně více atraktivní [35, 36].

Bylo identifikováno více než 100 různých monomerních jednotek jako složek PHA (Obrázek 5). Podle počtu uhlíkových atomů v monomerní jednotce je možné rozdělit PHA do dvou skupin na scl-PHA (short chain length) a mcl-PHA (medium chain length). V prvním případě jsou PHA tvořeny monomery z 3-5 atomů uhlíku, zatímco druhá skupina sestává z 6-14 uhlíků [37, 38].

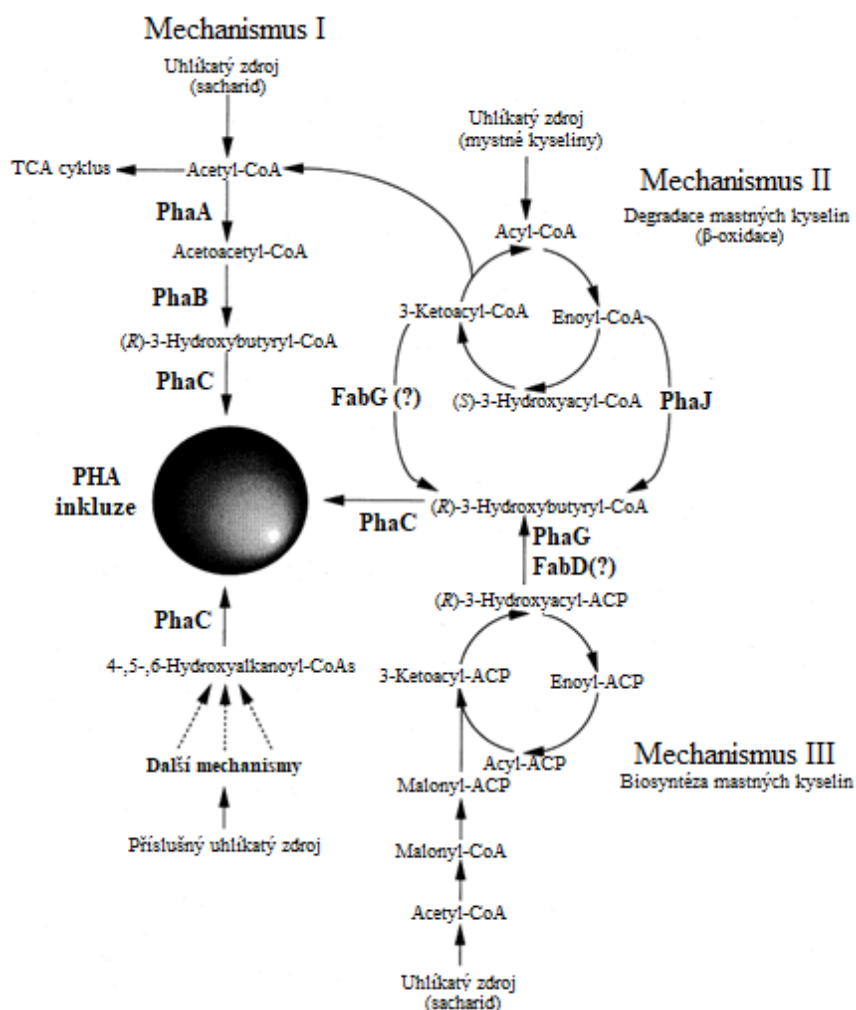


Obrázek 5: Monomerní jednotka PHA [37]

2.4.1.1 Biosyntéza

Akumulace PHA je přirozený způsob, jak bakterie ukládají uhlík a energii. Tyto polyestery jsou produkovány, jestliže je růst bakterií omezen nedostatkem dusíku, fosforu nebo kyslíku a přetrvávajícím nadbytkem uhlíkového zdroje. PHA jsou produkovány ve formě intracelulárních granulí. Povrch těchto granulí je potažen vrstvou fosfolipidů a bílkovin [35, 39].

Mikroorganismy jsou schopny produkovat PHA z různých zdrojů uhlíku, které se dělí na strukturně příbuzné polyhydroxyalkanoátům a zdroje, které nevykazují příbuzné rysy. Mezi strukturně příbuzné jsou řazeny mastné kyseliny, do druhé skupiny patří například glukóza. Na základě použitého substrátu je struktura PHA odlišná. K syntéze PHA vedou tři hlavní mechanismy (Obrázek 6), které se liší nejen použitým zdrojem uhlíku, ale také enzymy, které katalyzují vznik PHA [40, 41].



Obrázek 6: Hlavní mechanismy biosyntéza PHA [40]

První dráha představuje syntézu scl-PHA a je charakteristická pro bakterie *Cupriavidus necator*. Zdrojem uhlíku je zde sacharid. V prvním kroku kondenzují dvě molekuly acetyl-koenzymu A za vzniku acetoacetyl-CoA. V další fázi je acetoacetyl-CoA redukován enzymem acetyl-CoA-reduktázou na 3-hydroxybutyryl-CoA. Na závěr dochází k polymerizaci a esterifikaci a tím dochází ke vzniku poly(3-hydroxybutyrátu) [40].

Druhý mechanismus využívá meziprodukty β -oxidace a vede k syntéze mcl-PHA. Mastné kyseliny jsou převedeny na enoyl-CoA, následně dochází k transformaci pomocí *R*-3-hydroxyacyl-CoA-hydratázou na *R*-3-hydroxyacyl-CoA. Jedná se o základní kámen pro polymeraci mcl-PHA katalyzovanou mcl-PHA-syntázou. Typickým představitelem tohoto mechanismu syntézy PHA jsou například *Pseudomonas putida* nebo *Pseudomonas oleovorans* [41].

Třetí varianta syntézy PHA zahrnuje cyklus syntézy mastných kyselin *in situ*, který poskytuje *R*-3-hydroxyacyl-ACP. Zásadním enzymem, který převádí 3-hydroxyacyl-ACP na 3-hydroxyacyl-CoA, je hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza (PhaG). Vzniklý 3-hydroxyacyl-CoA je prekurzorem pro polymeraci s využitím mcl-PHA syntázou [42, 43].

2.4.1.2 Využití

V současné době jsou bioplasty stále dražší než plasty produkované petrochemicky, proto jsou využívány především v aplikacích, kde nemohou být použity běžné plasty, jako je například lékařství. Polyhydroxyalkanoáty jsou imunologicky inertní a jsou pomalu degradovány v lidské tkáni. Z tohoto důvodu mohou být aplikovány v těle, jako například samovstřebatelné nitě nebo implantáty. PHA mají využití také při regeneraci kostních tkání, kde tvoří mechanickou oporu a současně vyvolávají růst buněk. Dalším uplatněním je výroba nosičů léčiv ve farmakologii. Polyhydroxyalkanoáty ovšem nejsou využívány pouze v medicíně. V potravinářském průmyslu je možné se s nimi setkat ve formě potravinových fólií či sáčků, které řeší problémy se znečišťováním životního prostředí petrochemicky vyrobených plastů. Pro široké komerční využití je ovšem neustálou komplikací vysoké výrobní náklady PHA [35, 44-46].

2.4.2 Biosurfaktanty

Biosurfaktanty jsou mikrobiální sloučeniny vykazující výrazné povrchové a emulgační aktivity. Jedná se o amfipatické molekuly, tzn. obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní část. Tato skupina látek zahrnuje velké množství chemických struktur, podle kterých jsou převážně klasifikovány jako glykolipidy, fosfolipidy, polymerní biosurfaktanty a lipopeptidy (surfaktin). Nejznámějšími glykolipidy jsou rhamnolipidy, sophorolipidy a trehalolipidy. Vzhledem k variabilitě struktur lze očekávat i rozdílné vlastnosti a fyziologické funkce. Úpravou kultivačních podmínek a výběrem substrátu je možné tyto rysy modifikovat. Většina biosurfaktantů je považována za sekundární metabolity, ačkoliv některé látky mohou hrát zásadní roli pro přežití buňky jako, například usnadnění přenosu živin nebo působením biocidních činidel [47-49].

Biosurfaktanty mají ve srovnání s jejich chemicky syntetizovanými protějšky mnoho výhod. Hlavní předností je biologická rozložitelnost. Mikroorganismy snadno odbourávají biologické povrchově aktivní látky. Dále biosurfaktanty vykazují nízkou toxicitu. Další výhodou je dostupnost surovin. Biosurfaktanty je možné vyrábět z levných surovin, které jsou

k dispozici ve velkém množství, jako například odpadní látky z potravinářského průmyslu. Mnoho povrchově aktivních látek produkovaných mikroorganismy není ovlivněno fyzikálními faktory v prostředí, jako jsou teplota, pH, tolerance iontové síly [50-52].

2.4.2.1 Syntéza

Biosurfaktanty vykazují řadu různých amfipatických struktur. U biosurfaktantů všech druhů molekuly sestávají z hydrofobní a hydrofilní části. Z čehož vyplývá, že je nutné využít alespoň dvě různé syntetické dráhy. Jeden mechanismus vede k syntéze hydrofilní složky, zatímco druhý k hydrofobní. Hydrofobní složku mohou představovat různé varianty mastných kyselin, které podléhají běžným cestám metabolismu lipidů. Hydrofilní části vykazují komplikovanější struktury. Z tohoto důvodu jejich syntéza zahrnuje širokou škálu biosyntetických drah. Obecně existují čtyři principy biosyntézy amfifilních molekul:

1. hydrofilní a hydrofobní části jsou syntetizovány *de novo* pomocí nezávislých cest
2. syntéza hydrofobní části je závislá na substrátu, zatímco hydrofilní část je syntetizována *de novo*
3. syntéza hydrofilní části je závislá na substrátu, zatímco hydrofobní část je syntetizována *de novo*
4. syntéza obou zbytků závisí na použitém uhlíkovém substrátu.

Objasnění mechanismů pro určitý systém je důležité pro přípravu kultivačních médií a optimalizaci růstových podmínek pro produkci ve velkém měřítku, stejně jako pro indukci biosyntetických cest při přidávání prekurzorových molekul. Zdroj uhlíku ovlivňuje syntézu indukci nebo represí [53].

2.4.2.2 Využití

Vzhledem ke zvyšující se potřebě chránit ekosystém, je také zvýšený zájem o produkci biodegradabilních látek. Biosurfaktanty jsou proto potenciálními konkurenty syntetických povrchově aktivních látek. Chemicky syntetizované povrchově aktivní látky jsou vyráběné převážně z ropy, a proto znečišťují životní prostředí. Biosurfaktanty tedy získávají široké uplatnění nejen v zemědělství, lékařství, potravinářství, kosmetickém průmyslu, ale i při bioremediaci organicky a anorganicky kontaminovaných míst. Nejdůležitějšími biosurfaktanty pro komerční účely jsou glykolipidy a lipopeptidy [54].

V zemědělství se povrchově aktivní látky používají ke změně smáčivosti částic těžkých půd, aby bylo dosaženo rovnoměrné rozložení hnojiv v půdě. Významnější aplikací je bioremediace při odstraňování těžkých kovů ze zemin. Kromě těchto výhod jsou biosurfaktanty také velice biologicky aktivní – inhibice růstu bakterií, imunitní stimulant, inhibice růstu nádorů, antibiotika, antiastmatická aktivita, digesce potravin nebo stimulace enzymů [54-56].

Biosurfaktanty jsou také využívány pro přenos genů. V porovnání s komerčně dostupnými kationtovými liposomy vykazují liposomy na bázi biosurfaktantů zvýšení účinnosti transfekce. Dále se mikrobiální povrchově aktivní látky používají k produkci netoxických, nepyrogenních imunologických adjuvans, jestliže jsou smíchány s konvenčními antigeny. Bylo také zjištěno, že biosurfaktanty inhibují adhezi patogenních organismů na pevné povrchy. Díky tomu bylo sníženo množství mikrobiální kontaminace na protézách [57, 58].

Mnohé vlastnosti biosurfaktantů, jako je emulgace, deemulgace, pění, schopnost vázat vodu, rozpouštěcí a smáčecí vlastnosti, ovlivňování viskozity a konzistence produktu, jsou účinně využívány v kosmetickém průmyslu. Biologické povrchově aktivní látky jsou používány jako emulgátory, pěnidla, solubilizátory, smáčedla, čisticí prostředky, antimikrobiální činidla, mediátory působení enzymů ve formách krémů, kapalin, past, prášků, gelů a filmů [59].

2.4.3 Organické kyseliny

Za organické kyseliny se považuje skupina chemických látek obsahující jakoukoliv organickou karboxylovou kyselinu včetně mastných kyselin a aminokyselin s obecnou strukturou R-COOH. Organické kyseliny jsou slabé kyseliny a jsou jen částečně disociované. Organické kyseliny jsou spojovány se specifickou antimikrobiální aktivitou. Tento jev můžeme pozorovat u jednoduchých monokarboxylových kyselin jako jsou kyselina mravenčí, octová, propionová či máselná, nebo u karboxylových kyselin nesoucích hydroxylovou skupinu, obvykle na α -uhlíku, jejichž zástupci jsou kyselina mléčná, jablečná, vinná nebo citronová. U karboxylových kyselin s krátkým řetězcem obsahující dvojnou vazbu lze sledovat i antifungální aktivitu (kyselina sorbová, kyselina fumarová [60]).

2.4.4 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky zahrnují široké množství různých sloučenin. Přirozeně se vyskytují v rostlinách i živočiších jako obranné mechanismy. Tyto látky se také mohou běžně vyskytovat v potravinách nebo jako aditiva pro zvýšení jejich údržnosti. Vykazují bakteriostatické a bakteriocidní účinky. Antimikrobiální látky lze rozdělit podle několika hledisek. Podle celkového působení je můžeme dělit na antiparazitní látky, antitykotoxika, antivirotika, antituberkulotika a antibiotika. Látky působící lokálně jsou označovány jako antiseptika. Dalším způsobem dělení je podle jejich původu. Významnými třídami antimikrobiálních látek jsou lakto-antimikrobiální látky (př. laktoferin, laktoperoxidáza, laktoglobuliny a laktolipidy), ovo-antimikrobiální látky (př. lysozym, ovotransferin, ovoglobuliny a avidiny), fyto-antimikrobiální látky (př. saponin, flavonoidy, katechiny, glukosinoláty a agar), kyselé antimikrobiální látky (př. kyselina mléčná, kyselina sorbová, kyselina octová a kyselina citronová), anorganické antimikrobiální látky (př. chlorid sodný, polyfosfáty a ozon) a bacto-antimikrobiální látky (př. probiotika, bakteriociny, nisin, pediocin, reuterin a sakacin) [61].

Bakteriociny jsou bakteriální proteiny či peptidy syntetizované pomocí ribozomů. Jsou produkovány skupinami bakterií, které inhibují kmeny a druhy, které jsou obvykle, ovšem ne vždy, úzce příbuzné produkujícím bakteriím. Existuje pouze několik hlavních klasifikačních schémat pro rozdělení bakteriocinů produkovaných různými skupinami bakterií. Hlavními dvěma skupinami jsou třída I zahrnující lantibiotika a třída II obsahující nelantibiotické malé peptidy. Bakteriociny produkováné grampozitivními bakteriemi vzbudily pozornost díky jejich potenciálnímu využití jako konzervačních látek v potravinách, v zemědělství a v lékařství. Tyto bakteriociny mohou být použity k pokrytí povrchů obalů na ochranu potravin před patogeny. Antimikrobiální sloučeniny jsou také produkovány termofilními kmeny rodu *Geobacillus*. Například *G. thermoleovorans* a *G. stearothermophilus* produkují bakteriociny, jako jsou thermoleovoriny a thermociny. Průmyslový význam bakteriocinů produkovaných gram-

pozitivními termofilními endospory-tvořícími bakteriemi byl do jisté míry podceněn a dnes se dostává do popředí výzkumu [62-65].

Další významnou antimikrobiální sloučeninou produkovanou rody *Bacillus* a *Geobacillus* je bakteriocin zvaný nisin. Poprvé byl objeven v roce 1928 v Anglii během výroby sýru. Bakterie mléčného kvašení byly inhibovány příbuzným kmenem *Lactobacillus bulgaricus*. Nisin byl objeven přibližně 50 let před ostatními bakteriociny. Z tohoto důvodu byl také první průmyslově využívanou antimikrobiální látkou v potravinářství. Jedná se o malý, tepelně stabilní antimikrobiální peptid, řadící se do I. třídy bakteriocinů. Má široké antimikrobiální spektrum. Nisin se běžně využívá jako konzervační prostředek v produktech s vysokou vlhkostí a pasterizovaných tekutých vejcích. Dále se používá při výrobě přírodních sýrů, alkoholu a potravin s nízkým pH, například salátové dresinky. Další vývoj Nisinu směřuje k synergickému účinku ve spojení s chelatačními činidly a jinými bakteriociny. V lékařství probíhá vývoj vysoce purifikovaných nisinových preparátů zesilujících funkci chelatačních činidel pro humánní vředovou terapii a kontrolu mastitidy u skotu [61, 66].

2.4.5 Hydrolytické enzymy

Enzymy produkované mikrobiální cestou se dnes používají jako přísady pro celou řadu průmyslových aplikací včetně výroby krmiv a potravin. Termofilní hydrolytické enzymy nabízejí kompatibilitu s procesy, které optimálně probíhají při vyšších teplotách, mohou mít vysoký katalytický účinek a nabízejí odolnost proti mezofilní mikrobiální kontaminaci. Z tohoto důvodu je po termostabilních enzimech stále vyšší poptávka [67, 68].

Proteázy mají dlouhou historii v průmyslových procesech jako je zpracování kůže, výroba detergentů, syntéza peptidů, aplikace v potravinářském průmyslu a různé biotechnologické aplikace. Patří sem komerčně vyráběná metaloendopeptidáza *G. stearothermophilus* thermolysin, která se používá pro komerční syntézu prekursoru umělého sladidla aspartamu. Podskupina proteáz, která nalézá uplatnění v klinických aplikacích jsou termostabilní kolagenolytické proteázy [67, 68].

Lipázy preferují substráty nerozpustné ve vodě a hydrolyzují triglyceridy s dlouhým řetězcem. Lipázy obecně vykazují větší odolnost vůči organickým rozpouštědlům a obsahují hydrofobní doménu pokrývající aktivní místo, které způsobuje zvýšení aktivity při interakci s hydrofobním substrátem. Lipázy jsou stále častěji používány v kosmetickém průmyslu pro syntézu emolientních esterů, které zlepšují vlastnosti výrobků pro osobní hygienu. V potravinářském průmyslu se lipázy intenzivně podílejí na výrobě sýrů [68-70].

Jelikož enzymatické zkapalňování a sacharifikace škrobu probíhají při vysokých teplotách (100 až 110 °C), jsou pro výrobu hodnotných produktů jako je glukóza, krystalická dextróza, dextrózový sirup, maltóza a maltodextriny, velmi zajímavé termostabilní a termoaktivní amylolytické enzymy produkované termofilními mikroorganismy. V současnosti se používají termostabilní amylázy *Geobacillus stearothermophilus* nebo *Bacillus licheniformis*. Amylázy mají rozsáhlé komerční využití při zkapalňování škrobu v pivovarnictví, v textilním průmyslu a při výrobě papíru a detergentů [71, 72].

Xylanázy mají velký potenciál v biotechnologických aplikacích a využití v různých průmyslových procesech, jako je biokonverze lignocelulózového materiálu k fermentačním produktům, zlepšení konzistence piva a při produkci kyselých xylooligosacharidů, které mají potenciální farmakologické přínosy. Další možnou aplikací je uplatnění v průmyslu výroby

papíru, protože hydrolýza xylanu usnadňuje uvolňování ligninu z buničiny a snižuje použití chlóru jako bělicího činidla [73-76].

Celulázy se běžně používají v různých průmyslových odvětvích včetně potravinářství, pivovarnictví, vinařství, textilního a papírenského průmyslu, zemědělství a výrobě detergentů. Aplikace tepelně stálých celuláz je vhodná pro zvýšení účinnosti pracích prostředků a zlepšení drenáže buničiny [77-79].

Největší průmyslovou aplikací pektináz je extrakce ovocných šťáv a jejich čiření. Pektinázy v kombinaci s jinými enzymy (celulázy, xylanázy) přispívají ke zvýšení lisovací účinnosti plodů pro extrakci šťáv. Pektinolytické enzymy byly použity ve spojení s výše uvedenými enzymy, jako jsou amylázy, lipázy, celulázy k odstranění klíždí z bavlny ekologickým způsobem, na rozdíl od dříve využívaného hydroxidu sodného. Pektinázy se také využívají při čištění odpadních vod z potravinářského průmyslu. V potravinářském průmyslu se využívají pro zamezení tvorby pěny instantních čajových prášků [80-83].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité mikroorganismy

V praktické části diplomové práce pro screening bylo použito 9 kmenů bakterií z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM – Czech Collection of Microorganisms), 5 kmenů bakterií z německé sbírky Leibniz Institut v Braunschweig (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) a 2 bakterie izolovány z kalu Čistírny odpadních vod v Brně-Modřicích a předběžně identifikovány pomocí parciální sekvenace 16S rRNA genu (Tabulka 3).

Tabulka 3: Použité bakteriální kmeny

mikroorganismus	označení
<i>Saccharococcus thermophilus</i> CCM 3586	G1
<i>Geobacillus jurassicus</i> CCM 7224	G2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> CCM 2062	G3
<i>Geobacillus subterraneus</i> CCM 7225	G4
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> CCM 2809	G5
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> CCM 2565	G6
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> CCM 3731	G7
<i>Geobacillus uzenensis</i> CCM 7226	G8
<i>Geobacillus gargensis</i> CCM 7223	G9
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> DSM 5366	G10
<i>Geobacillus toebii</i> DSM 14590	G11
<i>Geobacillus zalihae</i> DSM 18318	G12
<i>Geobacillus lituanicus</i> DSM 15325	G13
<i>Geobacillus</i> sp. DSM 14791	G14
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25
<i>Bacillus licheniformis</i>	31

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly použity 2 kmeny gram-pozitivních bakterií a 2 kmeny gram-negativních bakterií (Tabulka 4)

Tabulka 4: Použité bakteriální kmeny pro antimikrobiální testy

mikroorganismus	sbírkové označení
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
<i>Serratia marcescens</i>	CCM 8587
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 1569
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCM 4418

3.1.2 Použité chemikálie

3.1.2.1 Chemikálie pro kultivaci

- Beef extract (HiMedia, Indie)
- Citronan amonno-železitý (Fluka, Švýcarsko)
- Citronan sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer, Česká republika)
- D-glukóza monohydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan draselný trihydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Chlorid amonný (LachNer, Česká republika)
- Chlorid sodný, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Chlorid vápenatý dihydrát, p.a. (Lachema, Česká republika)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, Indie)
- Nutrient broth (HiMedia, Indie)
- Pepton from soya (HiMedia, Indie)
- Sacharóza (LachNer, Česká republika)
- Síran amonný, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Síran hořečnatý heptahydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Síran manganatý monohydrát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Trypton (pepton from casein) (HiMedia, Indie)

3.1.2.2 Chemikálie pro screening uhľíkatých zdrojů

- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1,4-butandiol (Fluka, Švýcarsko)
- Arabinóza (Sigma-Aldrich, Německo)
- Celobióza (Lachema, Česká republika)
- D-fruktóza (LachNer, Česká republika)
- D-(+)-xylóza (HiMedia, Indie)
- Ethylacetát, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Galaktóza (LachNer, Česká republika)
- D-glukóza monohydrát p.a. (LachNer, Česká republika)
- Glycerol bezvodý, p.a. (LachNer, Česká republika)
- Karboxymethylcelulóza (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kasein (Sigma-Aldrich, Německo)
- Laktóza monohydrát (LachNer, Česká republika)
- Lecithin (VWR Chemicals, Spojené státy americké)
- Levulová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)
- Maltóza (Penta, Česká republika)
- Mannitol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Manóza (Sigma-Aldrich, Německo)
- Propan-1-ol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Propionát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

- Rhamnóza monohydrát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ribóza (VWR Chemicals, Spojené státy americké)
- Sacharóza (LachNer, Česká republika)
- Sorbitol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Škrob rozpustný (Penta, Česká republika)
- Valerová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)
- Xylan (VWR Chemicals, Spojené státy americké)

3.1.2.3 Chemikálie pro screening enzymů

- Agar powder (HiMedia, Indie)
- Elementární jód (Lachema, Česká republika)
- Jodid draselný (LachNer, Česká republika)
- Karboxymethylcelulóza (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, Indie)
- Kongo červeň (LachNer, Česká republika)
- Nutrien broth (HiMedia, Indie)
- Slunečnicový olej
- Spirit blue agar (HiMedia, Indie)
- Sušené odstředěné mléko (Bohemilk, Česká republika)
- Škrob rozpustný (Penta, Česká republika)
- Xylan (VWR Chemicals, Spojené státy americké)

3.1.2.4 Chemikálie pro analýzu biosurfaktantů

- Anthracen (Sigma-Aldrich, Německo)
- n-Hexan pro HPLC (VWR Chemicals, Spojené státy americké)
- Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2.5 Chemikálie pro screening antimikrobiálních látek

- Brain Heart Infusion Broth (HiMedia, Indie)
- Luria Broth (Sigma-Aldrich, Německo)
- Nutrient Broth (HiMedia, Indie)

3.1.2.6 Komponenty pro PCR, izolaci DNA a elektroforézu na agarózovém gelu

- Master mix OneTaq Hot Start (2x koncentrovaný) se standardním pufrem (New England Bio Labs, UK)
 - o 20 mM Tris-HCl
 - o 1,8 mM MgCl₂
 - o 22 mM NH₄Cl₂
 - o 22 mM KCl
 - o 0,2 mM dNTPs
 - o 5% glycerol
 - o 0,06% IGEPAL CA-630
 - o 0,05% Tween 20

- 25 jednotek/ml OneTaq Hot Start DNA polymeráza
- 25 mM MgCl₂ (ThermoScientific, Spojené státy americké)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Německo)
- sterilní voda Aqua pro injectione (B. Braun Medical, Německo)
- primery (Generi Biotech, Česká republika)
- agaróza (Sigma-Aldrich, Německo)
- DNA ladder – velikost fragmentů 3 000, 1 500, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp (Nippon Genetics Europe, Německo)

3.1.3 Použité přístroje

- laminární box Aura mini, BioAir – Euroclone (Spojené státy americké)
- temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000 (Česká republika)
- centrifuga U-32R – Boeco (Německo)
- analytické váhy PA224C – Pioneer (Švýcarsko)
- ELISA reader, BioTek, ELx808 (Německo)
- thermo-cycler MyCycler™ – BIO-RAD
- magnetická míchačka, Kartell, TKO (Spojené státy americké)
- nanofotometr, Implen, P300 (UK)
- blokový termostat Stuart SBH 200D – Bibby Scientific
- pH metr, pHTestr 30, Thermo Scientific (Nizozemí)
- plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm (Nizozemí)
- tenziometr, KSV, Sigma 701
- váhy Kern EW 620-3NM (Německo)
- duální vizualizační systém Ultra Viewer – Ultra Lum
- transiluminátor TVR 3121 – Spectroline
- běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Kultivace mikroorganismů

Bakterie sbírkových kmenů byly dodány v lyofilizovaném stavu, ze kterého byly dle přiložených instrukcí oživeny a kultivovány v inokulačním a poté produkčním médiu. Mikroorganismy byly následně uchovávány v Petriho miskách na pevných inokulačních médiích a ve formě kryokonzerv při -80 °C v 10% roztoku glycerolu.

Mikrobiální kultury označené 25 a 31 byly získány z aktivního kalu pomocí křížových roztěrů ze směsné kultury. Sekvenací 16S rRNA bylo zjištěno, že se jedná o *Bacillus amyloliquefaceins* a *Bacillus licheniformis*.

Všechna připravená média byla vysterilována a mikroorganismy byly poté sterilně zaočkovány v laminárním očkovacím boxu. Kultivace mikroorganismů probíhala při 50 °C, 180 rpm po dobu 48-72 hodin.

3.2.1 Inokulační média

Inokulační média byla připravována ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách vždy o objemu 50 ml. Doba kultivace inokula byla 24 hodin. Složení médií záviselo na použitém mikroorganismu (Tabulka 5).

Tabulka 5: Použité mikroorganismy s příslušnými inokulačními médii

mikroorganismus	označení	inokulum
<i>Saccharococcus thermophilus</i> CCM 3586	G1	68
<i>Geobacillus jurassicus</i> CCM 7224	G2	10
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> CCM 2062	G3	10
<i>Geobacillus subterraneus</i> CCM 7225	G4	10
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> CCM 2809	G5	10
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> CCM 2565	G6	10
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> CCM 3731	G7	10
<i>Geobacillus uzenensis</i> CCM 7226	G8	10
<i>Geobacillus gargensis</i> CCM 7223	G9	10
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> DSM 5366	G10	10
<i>Geobacillus toebii</i> DSM 14590	G11	220
<i>Geobacillus zalihae</i> DSM 18318	G12	220
<i>Geobacillus lituanicus</i> DSM 15325	G13	10
<i>Geobacillus</i> sp. DSM 14791	G14	220
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25	NB
<i>Bacillus licheniformis</i>	31	NB

Přesná složení inokulačních médií jsou uvedena v následujících tabulkách (Tabulka 6, Tabulka 7, Tabulka 8 a Tabulka 9). Pro uchovávání mikroorganismů na Petriho miskách bylo do inokulačního média přidáno 17 g/l agaru.

Tabulka 6: Inokulační médium 10

látka	koncentrace [g/l]
pepton	5
meat extract	3
MnSO ₄ · H ₂ O	0,01

Tabulka 7: Inokulační médium 68

látka	koncentrace [g/l]
beef extract	5
pepton from casein (trypton)	3
glukóza	1
sacharóza	5

Tabulka 8: Inokulační médium 220

látka	koncentrace [g/l]
Pepton from casein (trypton)	15
Pepton from soya	5
NaCl	5
MnSO ₄ · H ₂ O	0,01

Tabulka 9: Inokulační médium NB

látka	koncentrace [g/l]
Nutrien Broth	25

3.2.2 Produkční média

Kultivace v produkčním médiu následovala po 24h inokulaci. Kultivace v produkčním médiu probíhala ve 250 ml Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml a zaočkováno v poměru 1:10. V rámci screeningu byly testovány čtyři minerální média a jedno komplexní. Jejich označení a složení je uvedeno níže (Tabulka 10, Tabulka 12, Tabulka 14, Tabulka 15 a Tabulka 17). V případě bakterií rodu *Geobacillus* byl přidáván monohydrát síranu manganatého o koncentraci 0,01 g/l. Nejčastěji používaným uhlíkatým zdrojem pro kultivaci bakterií byla glukóza. Pro zajištění všech nároků mikroorganismů byl po sterilaci přidán roztok stopových prvků označený jako MES, TES a TES II (Tabulka 11, Tabulka 13, Tabulka 16).

Tabulka 10: Minerální médium 1 (MM 1)

látka	koncentrace [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
NH ₄ Cl	1
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02
NH ₄ Fe ^{III} citrát	0,0012
Kvasničný extrakt	0,5
Uhlíkatý zdroj*	5-20
TES II*	1 ml/l

* přidáno po sterilaci

Tabulka 11: TES II

látka	koncentrace [g/l]
EDTA	50
FeCl ₃	8,3
ZnCl ₂	0,84
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1
MnCl ₂ · 6 H ₂ O	0,016
H ₃ BO ₃	0,1

Tabulka 12: Minerální médium 2 (MM 2)

látka	koncentrace [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1
KH ₂ PO ₄	1,02
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
Kvasničný extrakt	0,5
Uhlíkatý zdroj*	5-20
MES*	1 ml/l

* přidáno po sterilaci

Tabulka 13: MES

látka	koncentrace [g/l]
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	9,7
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	7,8
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,156
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,119
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,118
ZnSO ₄ · 6 H ₂ O	0,1
0,1 M HCl	1 000 ml

Tabulka 14: Minerální médium 3 (MM 3)

látka	koncentrace [g/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	9,02
KH_2PO_4	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,1
$\text{NH}_4\text{Fe}^{\text{III}}\text{citrát}$	0,06
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
Kvasničný extrakt	0,5
Uhlíkatý zdroj*	5-20
TES*	1 ml/l

* přidáno po sterilaci

Tabulka 15: Minerální médium 4 (MM 4)

látka	koncentrace [g/l]
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$	4,8
KH_2PO_4	1,5
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2
Kvasničný extrakt	0,5
Uhlíkatý zdroj*	5-20
TES*	1 ml/l

* přidáno po sterilaci

Tabulka 16: TES

látka	koncentrace [g/l]
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	1,5
H_3BO_3	0,15
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,15
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,12
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,12
$\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,06
$\text{CuSO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,03
KI	0,03

Tabulka 17: Komplexní médium dle Markuse

Látka	Koncentrace [g/l]
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9
KH ₂ PO ₄	1,5
Nutrien Broth	8
Kvasničný extrakt	4
Uhlíkatý zdroj*	5-20

* přidáno po sterilaci

3.3 Stanovení obsahu biomasy

Biomasa byla stanovována gravimetricky. Biomasa byla získávána z 10 ml produkčního média, které bylo odebíráno pipetou do centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly odstředovány při 6 000 rpm po dobu 5 minut. Poté byl odlit supernatant, který byl dále využit na stanovení některých metabolitů. Následně byla získaná biomasa promyta 5 ml destilované vody a opět odstředena při 6 000 rpm po dobu 5 minut. Po odstředění byla přebytečná voda slita a vzorky byly sušeny do konstantní hmotnosti.

3.4 Screening utilizace uhlíkatých zdrojů

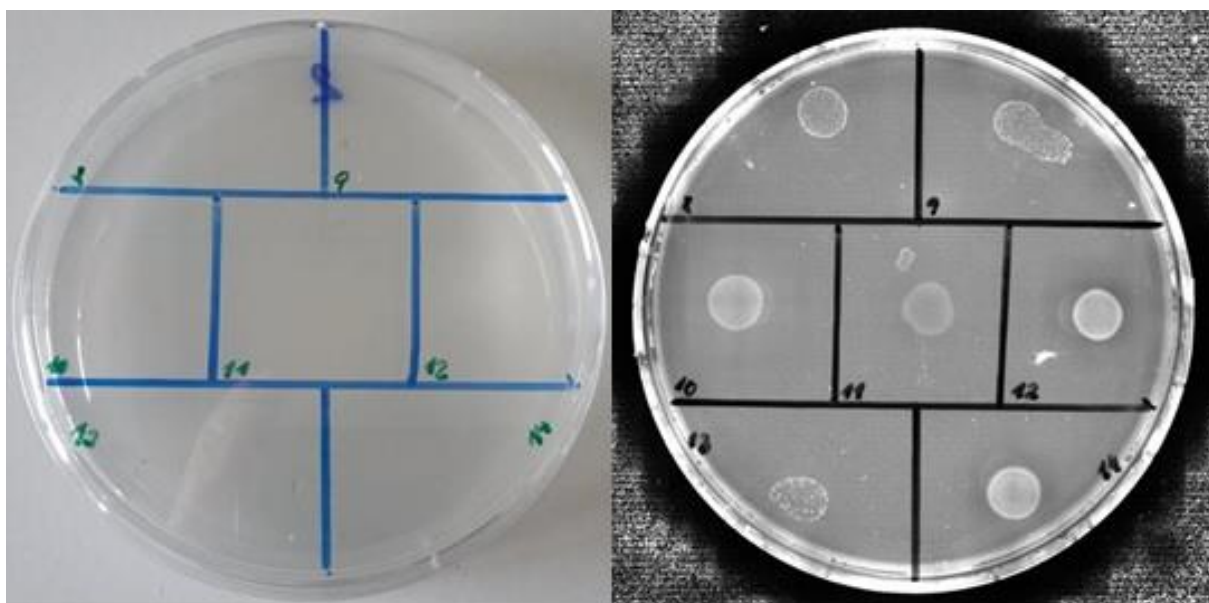
Bakterie rodu *Bacillus* a *Geobacillus* byly testovány na schopnost utilizace mono-, di- i polysacharidových uhlíkatých zdrojů (Tabulka 18) a nesacharidových (Tabulka 19). Screening probíhal na Petriho miskách (Obrázek 7) na pevném minerálním médiu 1 vždy s uhlíkatým zdrojem uvedeným v tabulkách 17 a 18. Testované bakterie byly kultivovány 24 hodin v termostatu při 50 °C.

Tabulka 18: Uhlíkaté zdroje – sacharidové

označení	uhlíkatý zdroj
1	glukóza
2	laktóza
3	xylóza
4	sacharóza
5	fruktóza
6	škrob
7	maltóza
8	arabinóza
9	mannitol
10	galaktóza
11	karboxymethylcelulóza
12	celobióza
13	rhamnóza
14	ribóza
15	manóza
16	sorbitol

Tabulka 19: Uhľikáté zdroje – nesacharidové

označení	uhľikátý zdroj
propa	propanol
kas	kasein
γ -bl	γ -butyrolakton
val	kyselina valerová
xyl	xylan
eth	ethylacetát
1,4-B	1,4-butandiol
lev	kyselina levulová
propí	propionát sodný
gly	glycerol



Obrázek 7: Screening uhľikátých zdrojů (sorbitol) – rozložení bakterií na Petriho misce

3.5 Screening produkce biosurfaktantů

U zástupců bakterií rodu *Bacillus* a *Geobacillus* byl proveden screening produkce biosurfaktantů pomocí tří metod – solubilizace krystalického anthracenu (3.5.1), stanovení emulgační aktivity (3.5.2) a metoda Du-Noüy-Ring (3.5.3). Stanovení probíhala ze supernatantů po 48 hodinách kultivace.

3.5.1 Solubilizace krystalického anthracenu (Solubilization of crystalline)

Pro analýzu produkce biosurfaktantů pomocí solubilizace krystalického anthracenu bylo použito 5 ml supernatantu, který byl pipetován do centrifugačních zkumavek obsahujících krystalky anthracenu. Takto připravené vzorky byly 24 hodin protřepávány při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány (6 000 rpm, 5 minut). Následně byly vzorky změřeny spektrofotometricky při 354 nm v křemenných kyvetách. Při přípravě vzorků byla souběžně

připravena pozitivní (povrchově aktivní látka – 5% roztok Triton X-100) a negativní kontrola (voda). Množství solubilizovaného anthracenu koreluje s množstvím biosurfaktantů [84].

3.5.2 Stanovení emulgační aktivity (Emulsification capacity assay)

Do skleněných zkumavek bylo pipetováno 3 ml hexanu a 3 ml testovaného vzorku. Takto vytvořená směs byla promíchávána po dobu 1 minuty na vortexu. Stejným způsobem byla připravena také pozitivní (5% roztok Triton X-100) a negativní kontrola (voda). Vzorky byly ponechány v klidu 24 hodin při laboratorní teplotě. Vzniklá emulgovaná vrstva byla proměřena posuvným měřítkem. Z naměřených hodnot byl vypočten emulgační index E_{24} podle rovnice

$$E_{24} = \frac{h_{emulze}}{h_{tot}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

kde h_{emulze} – výška emulgační vrstvy, h_{tot} – celková výška kapaliny. Přítomnost povrchově aktivních látek je potvrzena, pokud vznikne emulgační vrstva. Emulgační index souvisí s množstvím biosurfaktantů [85].

3.5.3 Metoda du-Noüy-Ring

Metoda du-Noüy-Ring je jednou z nejčastěji využívaných technik pro měření povrchového napětí na rozhraní kapalina-vzduch s použitím platinového kroužku. Měření bylo provedeno pomocí automatizovaného tenziometru KSV Sigma 701 a softwaru SGSERVER, kde bylo možné nastavit veškeré potřebné parametry. Pro uskutečnění pokusu bylo potřeba alespoň 30 ml vzorku. Jako pozitivní kontrola byl použit 5% roztok Triton X-100 a negativní kontrola byla tvořena vodou. Jedno měření trvalo 10 minut, přičemž bylo získáno přibližně 20 hodnot, které byly exportovány do MS Excel, kde proběhlo jejich vyhodnocení. Mikroorganismus je za slibnou kulturu považován tehdy, je-li schopen snížit povrchové napětí na 40 mN/m nebo méně [86, 87].

3.6 Screening produkce enzymů

Bakterie rodu *Bacillus* a *Geobacillus* byly kultivovány na pevném médiu na Petriho miskách. Kultivace probíhala při 50 °C po dobu 48 hodin. Pro screening různých enzymů bylo vždy voleno vhodné médium rozpuštěné v destilované vodě, které bylo před kultivací sterilováno. Aktivita proteáz byla testována na pevném médiu obsahujícím 8 g/l nutrient broth, 10 g/l sušeného odstředěného mléka a 17 g/l agar. Přítomnost proteáz byla potvrzena vznikem průhledných zón kolem kolonie bakterií, což dokazovalo rozklad kaseinu. Aktivita lipáz byla provedena na pevném médiu tvořeném 32,15 g/l Spirit blue agarem. Po sterilaci byl přidáno 30 ml/l sterilního slunečnicového oleje. Přítomnost lipáz byla ověřena odbarvením agaru. Přítomnost amyláz byla testována na pevném médiu obsahujícím 1 g/l kvasničného extraktu, 5 g/l rozpustného škrobu a 17 g/l agar. Po kultivaci byl agar barven Lugolovým roztokem (100 g/l jodidu draselného a 50 g/l elementárního jódu, rozpouštědlo – destilovaná voda). Vznik světlejších zón okolo bakterií potvrzoval aktivitu amyláz. Aktivita xylanáz byla testována na pevném médiu sestávajícím z 1 g/l kvasničného extraktu, 5 g/l xylanu a 17 g/l agar. Po kultivaci bylo médium barveno Kongo červení. Přítomnost xylanáz byla potvrzena

výskytem odbarvených zón kolem kolonií bakterií. Posledními testovanými enzymy byly celulózy. Pokus byl proveden na pevném médiu obsahujícím 1 g/l kvasničného extraktu, 5 g/l karboxymethylcelulózy a 17 g/l agaru. Po kultivaci byl agar barven Kongo červení. Aktivita celuláz byla potvrzena vznikem odbarvených zón kolem kultivovaných bakterií [88].

3.7 Stanovení organických kyselin

Organické kyseliny byly stanoveny pomocí iontové chromatografie s vodivostním detektorem na externím pracovišti. Pro stanovení byly testované vzorky (supernatant) desetkrát zředěny destilovanou vodou. Kultivace bakterií probíhala za aerobních i anaerobních podmínek na minerálním i komplexním médiu.

3.8 Stanovení antimikrobiální aktivity

Přítomnost antimikrobiálních látek byla testována pomocí bujónové diluční metody. Na mikrotitrační destičce byl pomocí měření zákalu zjišťován nárůst mikroorganismů. Na 96 jamkovou mikrotitrační destičku bylo k 150 μ l buněčné suspenze modelového mikroorganismu naředěného na optickou hustotu okolo 0,1 pipetováno 50 μ l supernatantu testovaného vzorku s předpokládanými antimikrobiálními účinky. Jako blank bylo místo 50 μ l supernatantu pipetováno 50 μ l sterilní vody. Nárůst buněk byl sledován po 24 hodinách kultivace při 37 °C. Jako modelové mikroorganismy byly použity 2 gram-negativní (*Serratia marcescens*, *Escherichia coli*) a 2 gram-pozitivní bakterie (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*). Pro zvýšení koncentrace antimikrobiálních látek bylo pipetováno 100 μ l buněčné suspenze modelového mikroorganismu a 100 μ l supernatantu.

3.9 Analýza produkce polyhydroxyalkanoátů

3.9.1 Identifikace PHA pomocí molekulárně biologické techniky

Pro identifikaci polyhydroxyalkanoátů pomocí molekulárně biologických technik bylo nutné nejprve izolovat DNA z bakterií. Do sterilní mikrozkušavky typu Eppendorf bylo napipetováno 100 μ l lyzačního pufru (5 mM Tris-HCl, pH 8,5). V lyzačním pufru byla rozsuspendovaná jedna klička mikrobiální kultury z Petriho misky. Takto připravená směs byla umístěna do termobloku na 15 minut při 90 °C. Poté byla mikrozkušavka zcentrifugovaná při 10 000 rpm po dobu 15 minut. Přibližně 60 až 70 μ l supernatantu bylo pipetováno do čisté sterilní mikrozkušavky typu Eppendorf. Po celou dobu izolace byly zajištěny sterilní podmínky.

Následně byla připravena PCR směs (Tabulka 20) pro multiplex PCR, která je prováděna pomocí primerů pro gen *16S* rRNA o velikosti 1500 bp, konkrétně 16S-F a 16S-R, a primerů pro gen *phaC* o velikosti 551 bp, a to G-D a G1-R. Gen *16S* rRNA se nachází u všech bakterií. Z tohoto důvodu se používá pro rychlou identifikaci bakterií. Primery G-D a G1-R selektivně amplifikují *phaC* gen kódující tvorbu syntázy třídy I a II. U každé reakce byla provedena pozitivní a negativní kontrola. Při pozitivní kontrole byla použita DNA mikroorganismu *Cupriavidus necator* (H16), u kterého byl potvrzený hledaný gen. Jako negativní kontrola byla připravena směs obsahující 2 μ l PCR vody navíc místo 2 μ l DNA.

Pomocí negativní kontroly bylo ověřeno, jestli nebyla některá z použitých komponent kontaminována.

Tabulka 20: Složení směsi pro multiplex PCR

PCR komponenta	objem [μ l]
Master mix*	12,5
16S-F	1,0
16S-R	1,0
PhaC G-D	1,0
PhaC G1-R	1,0
Mg ²⁺	2,6
DNA	2,0
PCR voda	3,9
celkový objem	25

* One *Taq*TM Hot Start 2x Master Mix with Standard Buffer

Pro amplifikaci Multiplex PCR byl zvolen teplotní program s annealingovou teplotou 55 °C (Tabulka 21).

Tabulka 21: Teplotní program pro Multiplex PCR

krok	T [°C]	t [s]	počet cyklů
1	94	30	1
2	94	30	30
	55	30	
	68	90	
3	68	300	1
	4	60	

Po provedení PCR byla stanovena přítomnost ampliconů pomocí elektroforézy za použití 2% agaróзовého gelu s přídatkem 7 μ l/100 ml Midori Green. Do jamek připravených v gelu bylo pipetováno 10 μ l směsi tvořené nanášecím pufrem a vzorkem a 5 μ l standardu s definovanou velikostí fragmentů (žebříček). Takto připravený gel byl vložen do elektroforetické vany a převrstven TBE pufrem. Byla provedena elektroforéza při napětí 90 V po dobu 90 minut. Po skončení elektroforézy byl gel pozorován na UV transiluminátoru.

3.9.2 Analýza PHA pomocí plynové chromatografie

Polyhydroxyalkanoáty byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s FID detekcí. Usušená biomasa z 10 ml produkčního média byla navážena do vialek v rozmezí 8-11 mg a rozpuštěna v 1 ml chloroformu. Poté bylo do směsi přidáno 0,8 ml roztoku 15% kyseliny sírové v methanolu s vnitřním standardem kyselinou benzoovou (5 mg/ml). Takto připravené vialky byly umístěny do termostatu na 3 hodiny při 95 °C, kde docházelo k hydrolýze polyhydroxyalkanoátů a esterifikaci za vzniku příslušných methylesterů. Následně bylo k vzorkům přidáno 0,5 ml 0,05M hydroxidu sodného. Vialky byly protřepány a ponechány k ustálení fází. Do čistých vialek bylo odebráno 50 μ l spodní fáze a napipetováno 950 μ l

chloroformu. Takto připravené vzorky byly analyzovány plynovou chromatografií s FID detekcí. Současně byla připravována také kalibrační přímka z komerčního polymeru P(3HB-*co*-3HV) s obsahem 3HV 12 %.

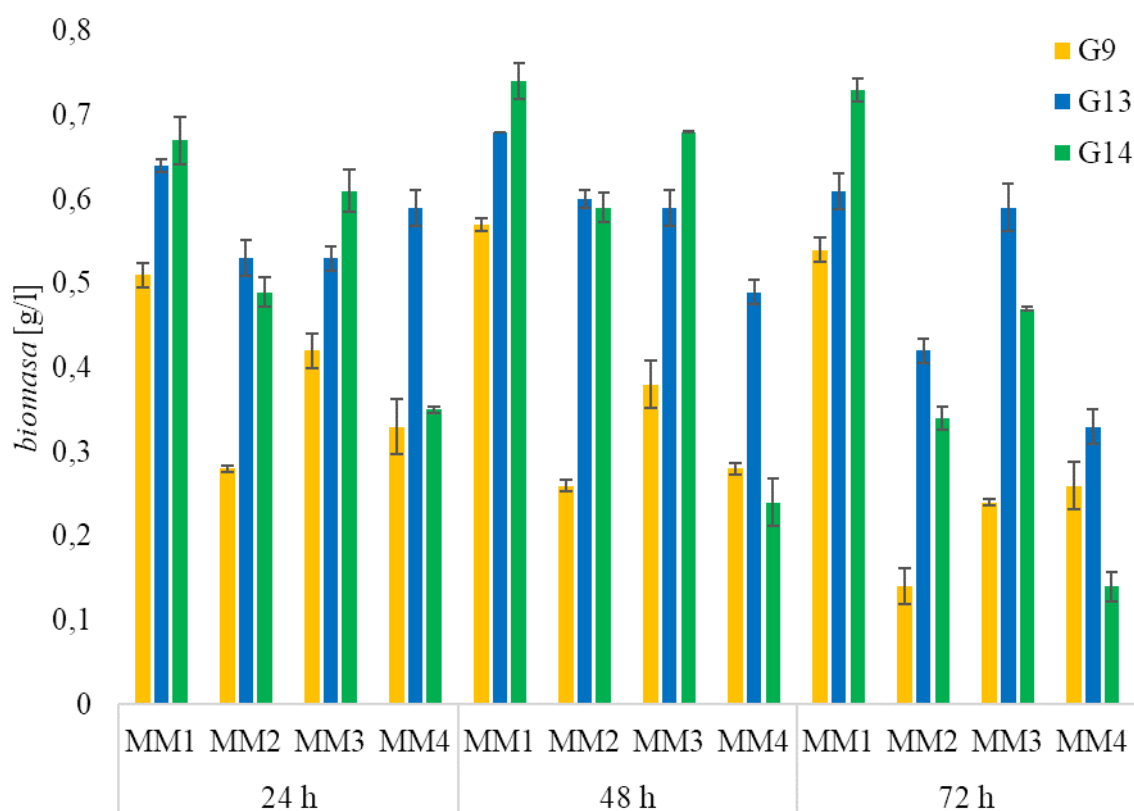
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Screening biotechnologického potenciálu sbírkových kmenů rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*

Využití extrémofilních bakterií v průmyslu je stále častější. Neustále je snaha nalézat nové produkční kmeny s co nejlepšími vlastnostmi. Mezi zajímavé kandidáty na producenty biotechnologicky využitelných metabolitů jsou i termofilní mikroorganismy rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*. Z tohoto důvodu byl u zmíněných bakterií proveden screening biotechnologického potenciálu.

4.1.1 Kultivační média

V rámci přehledu biotechnologického potenciálu bylo nutné zvolit vhodné médium, co možná nejuniverzálnější, na kterém bylo možné uskutečnit požadované screeningové testy. Vybraní zástupci bakterií rodu *Geobacillus*, konkrétně *G. gargensis* (G9), *G. lituanicus* (G13) a *Geobacillus sp.* (G14) byly kultivovány v minerálních médiích uvedených v experimentální části (Tabulka 10, Tabulka 12, Tabulka 14, Tabulka 15). Nárůst biomasy byl stanoven gravimetricky po 24, 48 a 72 hodinách.



Obrázek 8: Výběr vhodného minerálního média

Z obrázku 8 je patrné, že největší výtěžky biomasy byly získány při použití minerálního média 1. Na základě tohoto experimentu bylo dále během celé práce využíváno minerální médium 1, jako výchozí zdroj pro kultivace.

4.1.2 Schopnost utilizace uhlíkatých zdrojů

U vybraných zástupců bakterií rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus* byla testovaná schopnost utilizace uhlíkatých zdrojů. Nejprve byly testovány sacharidové uhlíkaté zdroje – glukóza, laktóza, xylóza, sacharóza, fruktóza, škrob, maltóza, arabinóza, manitol, galaktóza, karboxymethylcelulóza (CMC), celobióza, rhamnóza, ribóza, manóza, sorbitol a manit. Jako uhlíkaté zdroje nesacharidové byly vybrány ethylacetát, propionát sodný, kyselina levulová, γ -butyrolakton, xylan, 1,4-butandiol, kasein, kyselin valerová, propan-1-ol a glycerol.

Tabulka 22: Schopnost utilizace uhlíkatých sacharidových zdrojů bakteriemi rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
glukóza														
laktóza														
xylóza														
sacharóza														
fruktóza														
škrob														
maltóza														
arabinóza														
mannitol														
galaktóza														
CMC														
celobióza														
rhamnóza														
ribóza														
manóza														
sorbitol														



– bez nárůstu



– minimální růst

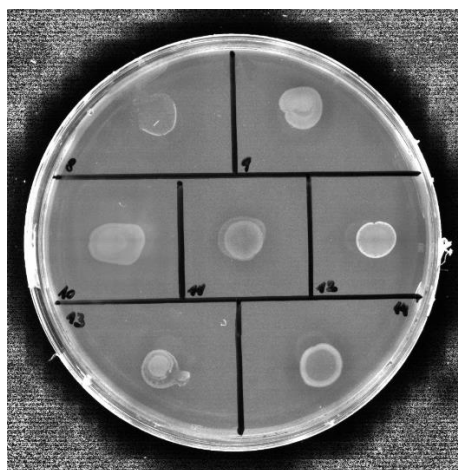


– střední růst



– intenzivní růst

Nejuniverzálnějšími sacharidovými zdroji pro kultivaci vybraných zástupců bakterií rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus* byly glukóza, laktóza, sacharóza, manóza, a sorbitol (Obrázek 9), což je patrné z tabulky 22. Naopak nejmenší nárůst kultur byl zaznamenán na arabinóze. Bakterie, které byly schopny využít všechny testované sacharidy, byly *G. thermocatenulatus* (G5), *G. toebii* (G11) a *G. zalihae* (G12). Pokud je zkoumaný mikroorganismus schopen růstu na mnoha různých uhlíkatých zdrojích, lze předpokládat, že bude schopen využít i rozmanité odpadní substráty, díky čemuž může dojít ke snížení nákladů při biotechnologických procesech. Na druhou stranu bakterie *G. thermodenitrificans* (G6) a *G. thermoglucosidasius* (G7) byly schopny růst pouze na několika substrátech jako například na glukóze, laktóze, sacharóze, rhamnóze a manóze. Vzhledem k tomu, že byla potvrzena jejich schopnost využít laktózy, je případně možné použít jako uhlíkatý substrát odpadní syrovátku z mlékárenského průmyslu. V případě sacharózy lze použít vedlejší produkty z cukrovarského průmyslu, a to například melasu. Výsledky screeningového experimentu potvrdily, že vybraná zástupci rodu *Geobacillus* jsou schopni využít velice široké spektrum sacharidických substrátů.



Obrázek 9: Utilizace sorbitolu bakteriemi G8-G14

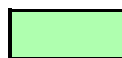
Přehled schopnosti utilizace nesacharidových uhlíkatých zdrojů je znázorněn v tabulce 23. Téměř všechny vybrané bakterie rodu *Geobacillus* byly schopny růst na všech testovaných nesacharidových zdrojích. Ovšem *Saccharococcus thermophilus* (G1) nenarostl ani na jednom z uvedených substrátů. Bakterie *G. uzenensis* (G8), *G. gargensis* (G9), *G. toebii* (G11), *G. zalihae* (G12) a *Geobacillus sp.*(G14) byly schopny využít všech deset testovaných substrátů. V případě nesacharidových uhlíkatých zdrojů můžeme potenciál shledávat například při využití odpadního substrátu jako je glycerol, který vzniká jako vedlejší produkt při výrobě mastných kyselin, bionafty nebo mýdel. Dále mohou nesacharidové substráty tvořit prekurzory zajímavých biotechnologických produktů, například kopolymery polyhydroxyalkanoátů.

Tabulka 23: Schopnost utilizace nesacharidových uhľikatých zdrojů bakteriemi rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
ethylacetát														
propionát sodný														
kyselina levulová														
γ -butyrolakton														
xylan														
1,4-butandiol														
kasein														
kyselina valerová														
propan-1-ol														
glycerol														



- bez nárůstu



- minimální nárůst



- střední růst



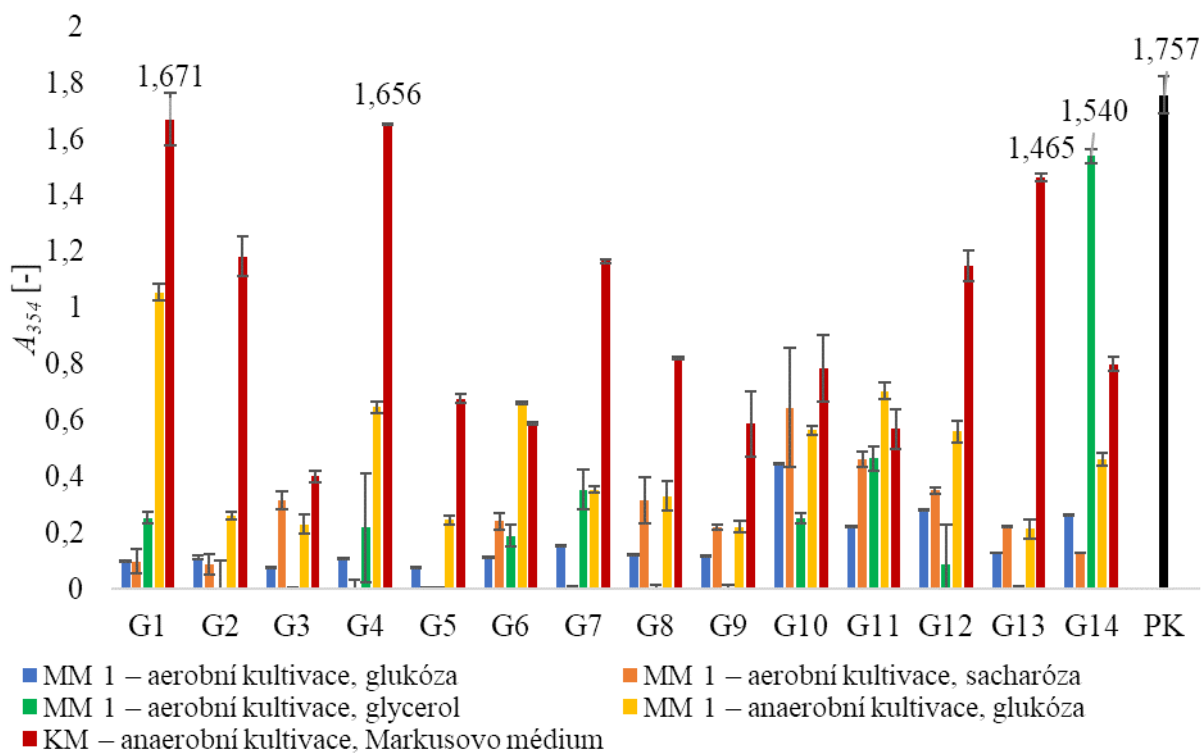
- intenzivní nárůst

4.1.3 Screening produkce biosurfaktantů

S neustále narůstající tendencí hledání alternativních obnovitelných zdrojů pro produkci povrchově aktivních látek, jsou biosurfaktanty vhodnými nástupci povrchově aktivních látek syntetizovaných z fosilních paliv. Mezi nesporné výhody patří jejich biodegradabilita a téměř netoxicity s minimálním ekologickým dopadem. Další předností biosurfaktantů jsou snadno dostupné suroviny pro jejich produkci [89]. Kultivace je možná i na odpadních substrátech z potravinářského průmyslu, čímž se značně snižuje jejich výrobní cena.

Pro screening biosurfaktantů byly vybrány metody, které jsou snadné, rychlé na přípravu testovaných vzorků a poskytnou dostatečný přehled o přítomnosti či absenci biosurfaktantů v produkčním médiu. Výskyt povrchově aktivních látek byl testován pomocí 3 metod – solubilizací krystalického anthracenu, stanovením emulgační aktivity a pomocí měření povrchového napětí metodou du-Noüy-Ring. Každá ze zmíněných metod charakterizuje produkovaný biosurfaktant jiným způsobem. Například bakterie produkující povrchově aktivní látku, která výrazně snižuje povrchové napětí (metoda du-Noüy-Ring), nemusí vykazovat přílišné emulgační schopnosti (stanovení emulgační aktivity).

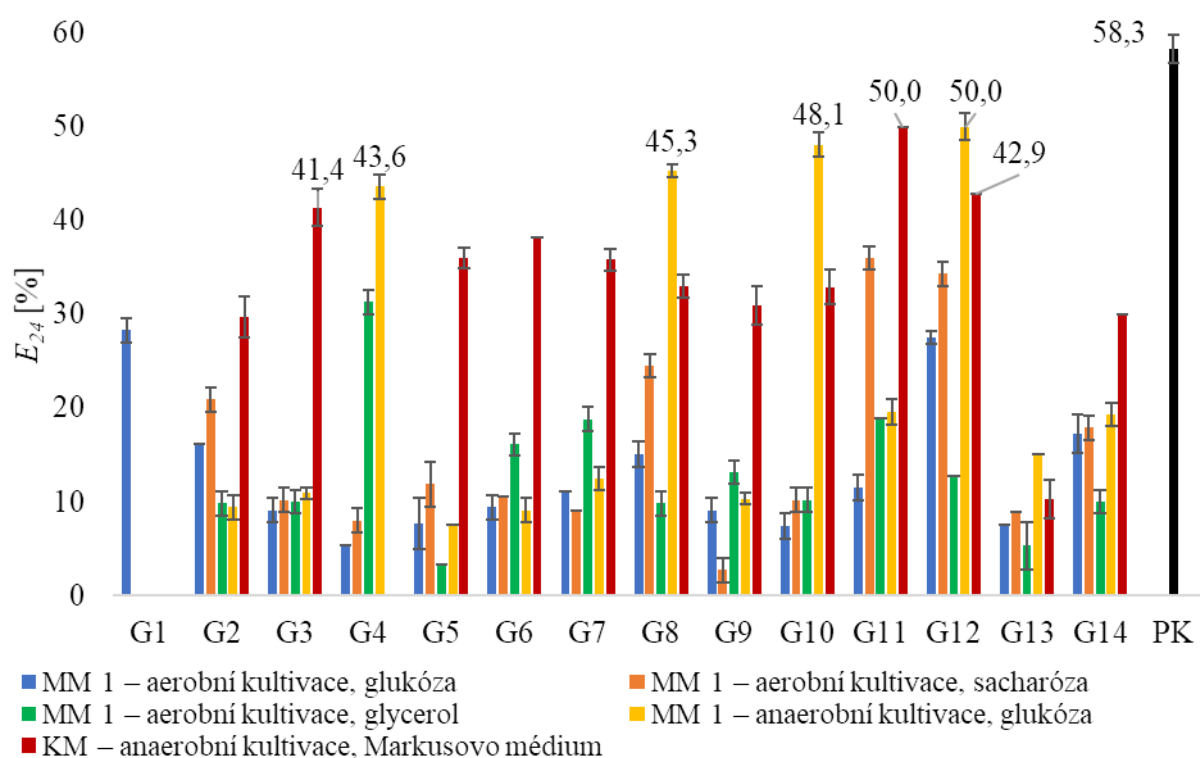
Solubilizace je postup, kdy se do micel biosurfaktantů včleňují další látky. Tato metoda se využívá pro látky, které jsou v čistém vodném médiu nerozpustné nebo jen velmi omezeně. V našem případě se jedná o anthracen, z čehož vyplývá, že množství solubilizovaného anthracenu souvisí s tvorbou micel biosurfaktanty přítomnými v médiu. Stanovení biosurfaktantů pomocí solubilizace krystalického anthracenu bylo měřeno fotometricky při 354 nm.



Obrázek 10: Stanovení biosurfaktantů – solubilizace krystalického anthracenu

Na obrázku 10 jsou uvedeny absorbance testovaných vzorků po odečtu absorbance naměřené u čistého média, jelikož i samotné médium je schopné solubilizovat anthracen. Téměř u všech supernatantů byla prokázána přítomnost biosurfaktantů. Povrchově aktivní látky byly nejvíce produkovány při anaerobní kultivaci na komplexním Markusově médiu (na obrázku 10 znázorněné červeně). V případě *Saccharococcus thermophilus* (G1) a *Geobacillus subterraneus* (G4) bylo dosaženo téměř totožné absorbance jako při pozitivní kontrole, kterou představuje 5% roztok komerčně dostupného surfaktantu Triton-X 100. Velmi dobré hodnoty byly získány také u bakterie *G. lituanicus* (G13) při kultivaci na komplexním médiu za anaerobních podmínek. Kmen *Geobacillus* sp. (G14) dosáhl jako jediný nadprůměrných hodnot při aerobní kultivaci. Při porovnání aerobní a anaerobní kultivace s glukózou bylo lepších výsledků dosaženo při anaerobní kultivaci. Tento jev může být způsoben tím, že při anaerobní kultivaci dochází k upřednostnění metabolismus zajišťujícího produkci biosurfaktantů. Účinnost solubilizace může být také ovlivněna přítomností dalších látek, které se na ní, kromě biosurfaktantů, podílejí.

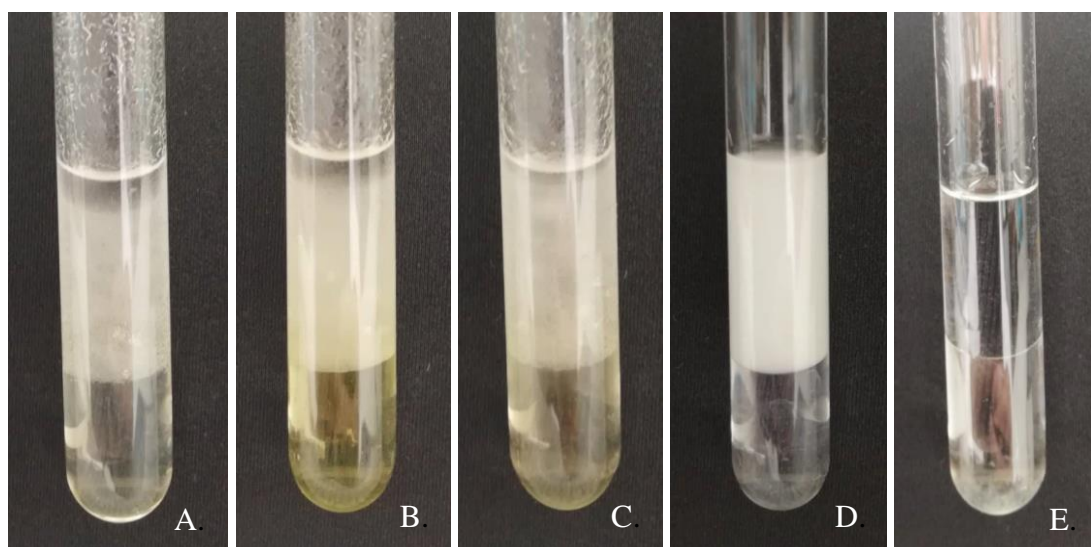
Dalším parametrem pro důkaz biosurfaktantu je tvorba emulze. Emulze je heterogenní systém tvořený disperzním prostředím a dispergovanou látkou nejčastěji ve formě malých kapiček. Emulgační aktivita povrchově aktivní látky je stanovena na základě vyhodnocení emulgačního indexu E_{24} dle výše uvedené rovnice (1).



Obrázek 11: Stanovení biosurfaktantů – stanovení emulgační aktivity

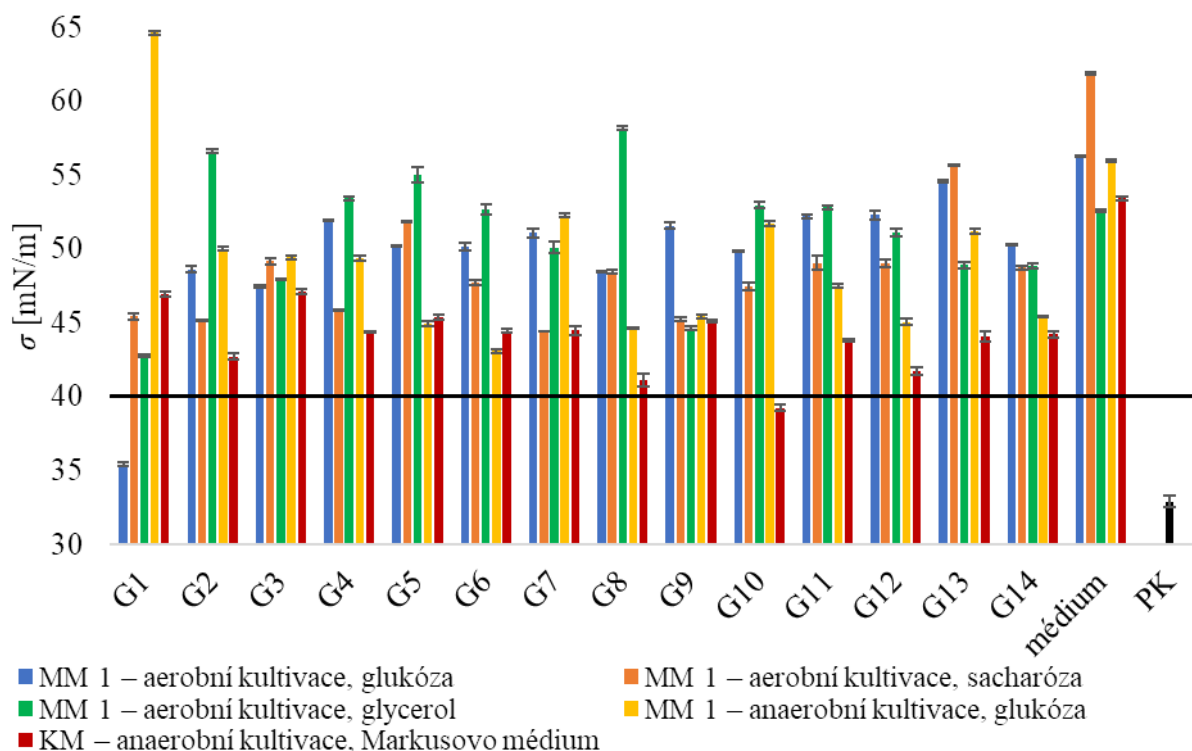
Všechny testované bakterie prokázaly alespoň v jednom z kultivačních médií schopnost produkce biosurfaktantů, jež jsou schopny vytvářet a udržovat emulgovanou vrstvu. U bakterie *Saccharococcus thermophilus* (G1) byla schopnost produkce povrchově aktivních látek s výše zmíněnými vlastnostmi prokázána pouze při aerobní kultivaci s glukózou jako uhlíkatým substrátem, při ostatních kultivacích nebyly biosurfaktanty podporující tvorbu emulzí

detekovány. Zástupci rodu *Geobacillus* byli schopni tvorby surfaktantů ve všech typech testovaných médií jak při aerobní, tak anaerobní kultivaci, kromě kmene *G. subterraneus* (G4), kde nedošlo ke vzniku emulze při testování supernatantu z kultivace v komplexním médiu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u bakterií *G. subterraneus* (G4, 43,6 %), *G. uzenensis* (G8, 45,3 %), *G. thermoleovorans* (G10, 48,1 %) a *G. zalihae* (G12, 50 %) při anaerobní kultivaci s glukózou jakožto substrátem (na obrázku 11 znázorněno žlutou barvou). Obdobných výsledků dosáhl tým vedený S. Manifem s kultivací bakterie *Geobacillus pallidus*, kdy emulgační index odpovídal 49 % [90]. Nadprůměrných výsledků bylo dosaženo také při anaerobní kultivaci na komplexním médiu dle Markuse (na obrázku 11 znázorněno červenou barvou). Emulgační index bakterie *G. toebii* (G11) dosáhl hodnoty 50 %. U bakterií *G. stearothermophilus* (G3) a *G. zalihe* (G12) byl poněkud nižší 41,4 % a 42,9 %. Čistá média netvořila žádnou emulzi, což potvrdilo, že před kultivací nebyly přítomny látky podílející se na tvorbě emulze. Porovnání vytvořených emulzí z produkčních médií s pozitivní kontrolou a kultivačním médiem znázorňuje obrázek 12.



Obrázek 12: Ukázka emulzí – A – *G. uzenensis* (G8), B – *G. thermoleovorans* (G10), C – *G. zalihae* (G12), D – pozitivní kontrola (PK), E – médium (M)

Metoda du-Noüy-Ring se řadí k nejčastěji využívaným postupům při měření povrchového napětí s využitím platinového kroužku. Stanovení biosurfaktantů metodou du-Noüy-Ring bylo realizováno pomocí automatizovaného tenziometru. Pomocí této metody získáváme přehled o schopnosti produkovaných biosurfaktantů snižovat hodnotu povrchového napětí. Podle studie vypracované D. G. Cooperem je za slibnou kulturu považován takový mikroorganismus, který je schopen vyprodukovat biosurfaktanty o takové síle, že dojde ke snížení hodnoty povrchového napětí produkčního média na 40 mN/m a méně [87]. Pro představu povrchové napětí destilované vody při 20 °C odpovídá hodnotě 72,75 mN/m, v některých publikacích se můžeme setkat i s hodnotou 73 mN/m. Z toho je patrné, že již čistá média obsahovala látky snižující povrchové napětí (Obrázek 13).



Obrázek 13: Stanovení biosurfaktantů – metoda du-Noüy-Ring

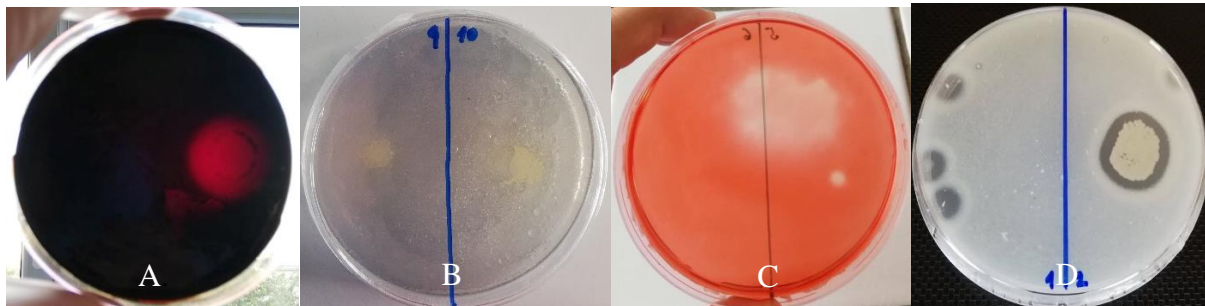
Na obrázku 13 je patrné, že snížení povrchového napětí pod 40 mN/m bylo docíleno produkcí dvou bakterií, a to *Saccharococcus thermophilus* (G1, 35,4 mN/m) při aerobní kultivaci na minerálním médiu s glukózou jako substrátem a *G. thermoleovorans* (G10, 39,3 mN/m) při anaerobní kultivaci na komplexním médiu. Blízko hranice 40 mN/m se také pohybovaly bakterie *G. uzenensis* (G8) a *G. zalihae* (G12) okolo 41 mN/m. Celkově můžeme konstatovat, že největšího snižování povrchového napětí bylo dosaženo při anaerobní kultivaci na komplexním médiu (na obrázku 13 znázorněno červeně). Naopak ke zvýšení povrchového napětí oproti čistému médiu nastalo při aerobní kultivaci s uhlíkatým zdrojem glycerolem a u bakterie *Saccharococcus thermophilus* (G1) při anaerobní kultivaci na glukóze.

V rámci screeningu biosurfaktantů bylo možné pozorovat, že pokud je mikroorganismus schopen produkovat ve větší míře povrchově aktivní látky napomáhající tvoření emulzí, produkce surfaktantů snižujících hodnotu povrchového napětí či schopnost solubilizace je výrazně nižší. Jedním z příkladů je kmen *Saccharococcus thermophilus* (G1), který byl schopen snížit povrchové napětí pod hranici 40 mN/m, ovšem při schopnosti solubilizovat anthracen byly naměřené výsledky značně podprůměrné. Lze z toho tedy usuzovat, že daný kmen produkuje biosurfaktanty s rozličnými schopnostmi, ale obvykle jeden typ převažuje.

4.1.4 Screening produkce hydrolytických enzymů

Enzymy jsou v průmyslovém odvětví hojně využívány od příměsí do pracích prášků až po štěpení složitých sloučenin. Jejich omezením bývá účinnost při nižších teplotách. Z tohoto důvodu se neustále zkoumají noví termofilní producenti, kteří jsou schopni produkovat termostabilní enzymy. Produkce průmyslově významných enzymů byla již u některých zástupců rodu *Geobacillus* popsána. Například produkce termostabilních xylanáz pomocí *Geobacillus sp.*, či lipázy pomocí druhu *Geobacillus thermoleovorans* [91, 92].

Schopnost produkovat extracelulární hydrolytické enzymy byla ověřena podle postupů uvedených v kapitole 3.6 u všech vybraných zástupců rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*. Přítomnost enzymu byla prokázána přítomností čisté nebo světlejší zóny okolo narostlé kultury, jak je patrné z obrázku 14.



Obrázek 14: Testování enzymů – A – amylázy (G13), B – lipázy (G9, G10), C – celulázy (G5), D – proteázy (G2)

Zda byla u zkoumaných mikroorganismů prokázána schopnost produkce hydrolytických enzymů, konkrétně proteáz, amyláz, lipáz, celuláz a xylanáz, či nikoliv, je přehledně uvedeno v tabulce 24. Lipolytické enzymy byly detekovány u všech vybraných zástupců rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*. Jako univerzální producenti testovaných enzymů se jeví *G. jurassicus* (G2), *G. uzenensis* (G8) a *G. lituanicus* (G13). Naopak *S. thermophilus* (G1), *G. stearothermophilus* (G3) a *Geobacillus* sp. (G14) nebyly kromě lipázy schopny extracelulárně produkovat žádný jiný zkoumaný enzym.

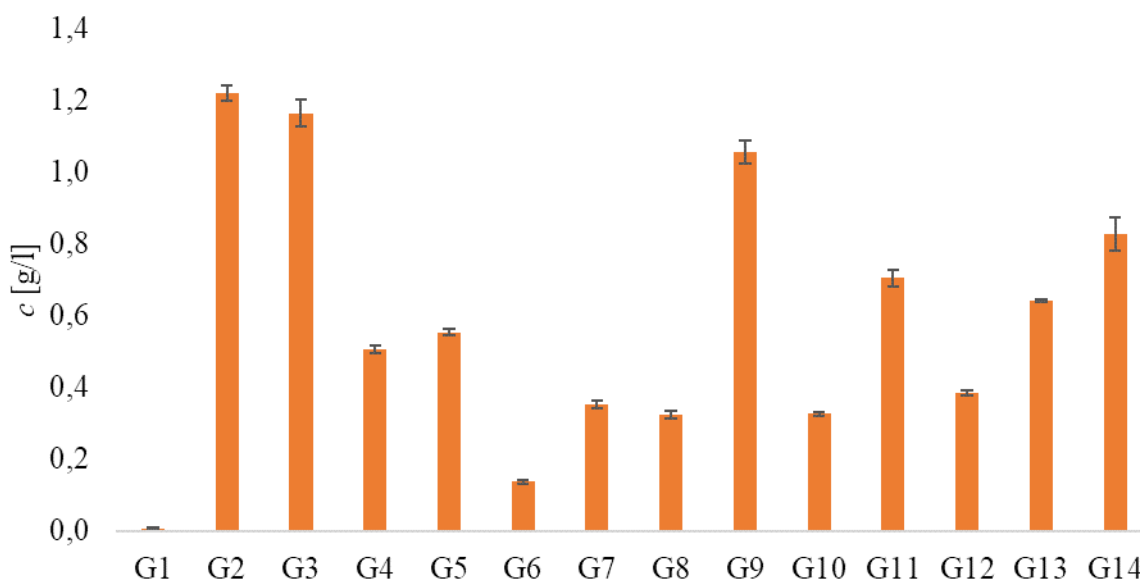
Tabulka 24: Schopnost produkce hydrolytických enzymů

	proteázy	amylázy	lipázy	celulázy	xylanázy
G1					
G2					
G3					
G4					
G5					
G6					
G7					
G8					
G9					
G10					
G11					
G12					
G13					
G14					

- produkce nepotvrzena
 - produkce potvrzena

4.1.5 Screening produkce organických kyselin

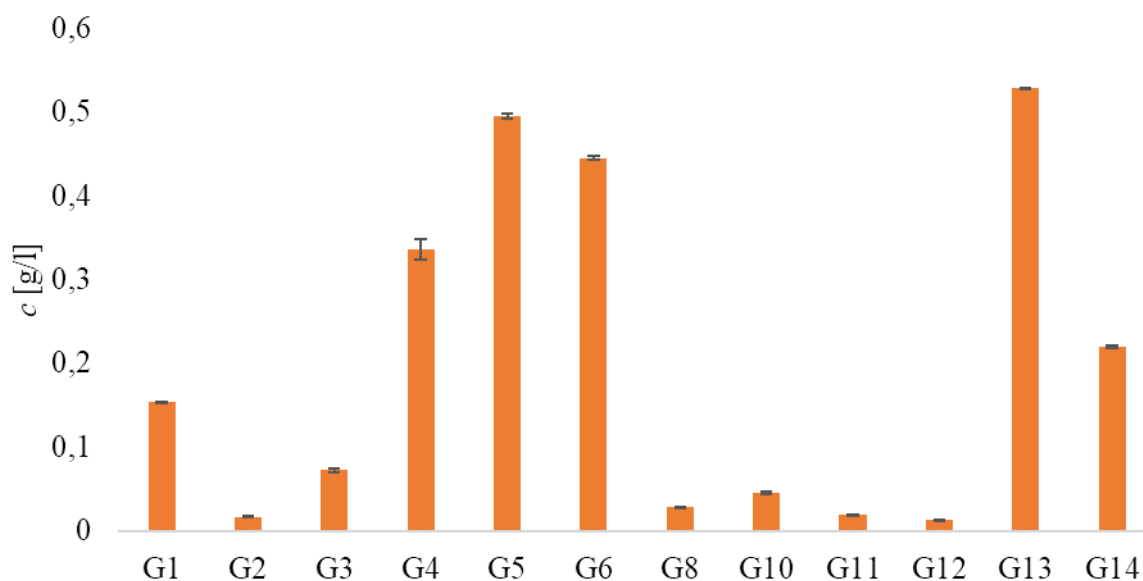
Organické kyseliny zahrnují velké množství látek, z čehož vyplývá i jejich rozličné využití. Komerčně nalézají uplatnění jako aditiva v potravinářství, či jako pomocné látky ve farmacii nebo kosmetickém průmyslu. Dalším uplatněním je odstraňování kovů z půdy. Tyto vlastnosti vykazují do jisté míry i kyselina mléčná a octová. Kyselina mléčná je také hojně využívána na produkci polymeru kyseliny polymléčné [93]. Při screeningu byl důraz kladen právě na tyto organické kyseliny. Kultivace bakterií pro stanovení organických kyselin byla prováděna za aerobních i anaerobních podmínek na minerálním a komplexním médiu.



Obrázek 15: Produkce kyseliny octové za anaerobních podmínek na minerálním médiu 1

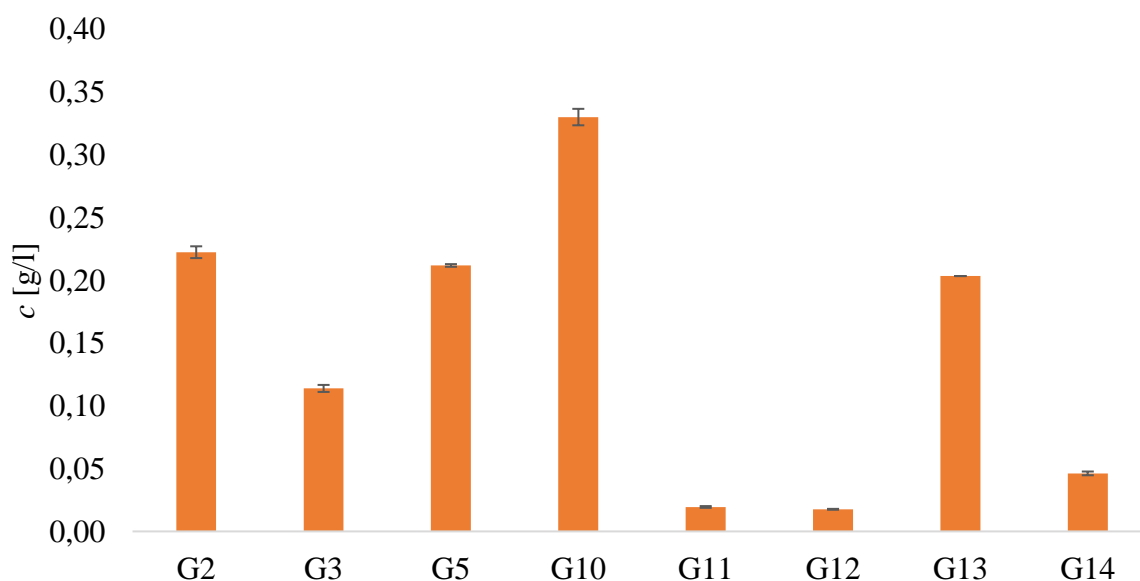
Nejvyšší produkce kyseliny octové bylo dosaženo za anaerobních podmínek (Obrázek 15), konkrétně u bakterií *G. jurassicus* (G2, 1,22 g/l), *G. stearothermophilus* (G3, 1,17 g/l) a *G. gargensis* (G9, 1,06 g/l). Naopak nejnižší výtěžek byl prokázán u bakterií *Saccharococcus thermophilus* (G1, 0,01 g/l) a *G. thermodenitrificans* (0,14 g/l).

Z obrázků 15 a 16 je patrné, že bakterie, které příliš neprodukovaly kyselinu octovou za anaerobních podmínek, dosahovaly vyšších výtěžků při aerobní kultivaci a naopak. Aerobní podmínky prospívaly bakteriím *G. thermodenitrificans* (G6, 0,45 g/l) a *Saccharococcus thermophilus* (G1, 0,15 g/l). V případě kmenu *Saccharococcus thermophilus* (G1) je vyšší výtěžnost za aerobních podmínek způsobena tím, že se jedná o striktně aerobní mikroorganismus. I při anaerobní kultivaci bylo možné pozorovat mírný nárůst této kultury, jelikož na počátku kultivace bylo přítomno malé množství kyslíku, ovšem pro schopnost produkce bylo toto množství nedostačující. Celkově nižší výtěžnost kyseliny octové při aerobní kultivaci mohla být zapříčiněna limitací kyslíku, jelikož při vyšších teplotách se stává kyslík méně rozpustným.



Obrázek 16: Produkce kyseliny octové za aerobních podmínek na minerálním médiu 1

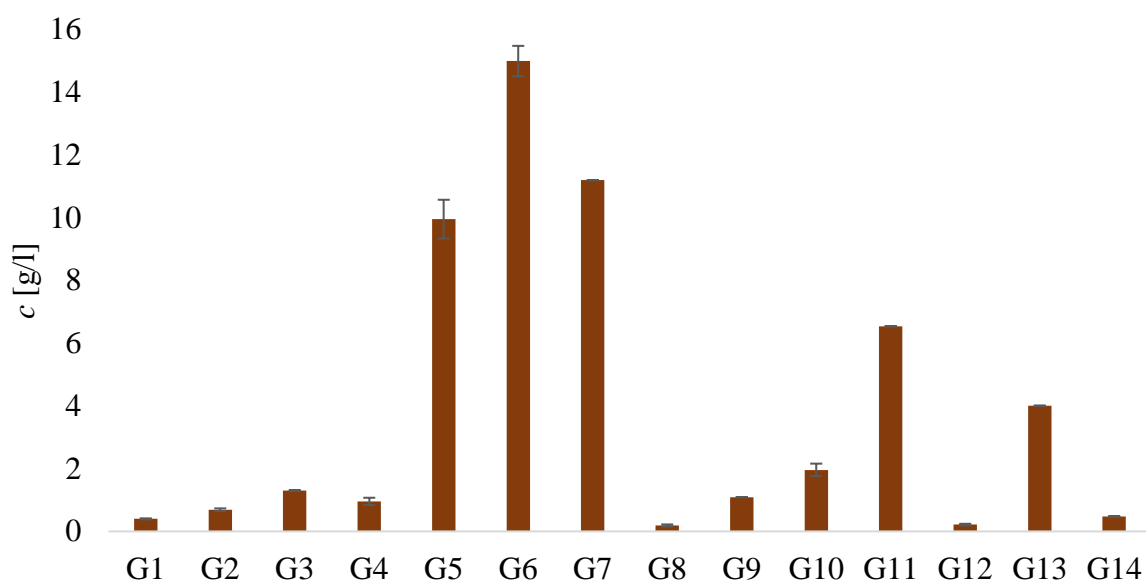
Při srovnání kultivace v minerálním médiu 1 (Obrázek 15) a v komplexním médiu (Obrázek 17) za anaerobních podmínek byla kyselina octová produkovaná ve vyšší míře v minerálním médiu 1. Při kultivaci v komplexním médiu nebylo dosaženo ani poloviny množství, co v minerálním médiu 1.



Obrázek 17: Produkce kyseliny octové za anaerobních podmínek na komplexním médiu dle Markuse

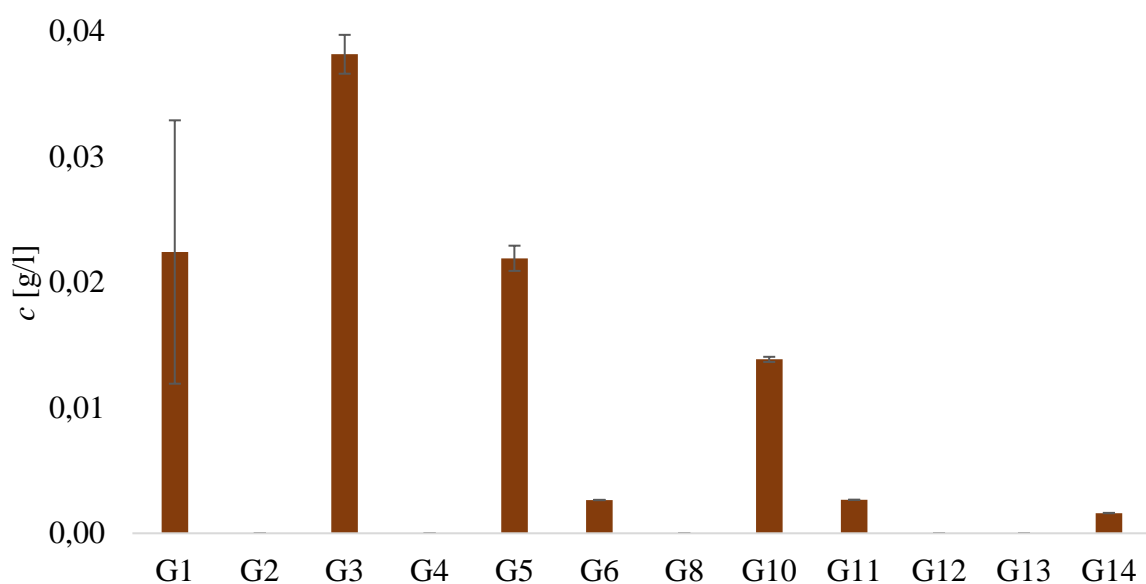
Kyselinu mléčnou je možné vyrobit chemickou syntézou nebo mikrobiální fermentací, která je majoritním zdrojem produkce. Produkce laktátu již byla pro některé kmeny rodu *Geobacillus* popsána. Například tým M. Semerilli se zabýval produkcí kyseliny mléčné pomocí kmenů *Geobacillus stearothermophilus* za nesterilních podmínek [94]. Ve srovnání s bakteriemi mléčného kvašení, které jsou hlavními producenty a jsou schopné produkovat až 120 g/l (*Lactobacillus casei*) kyseliny mléčné [95], byly v tomto experimentu výtěžky produkované

pomocí bakterií rodu *Geobacillus* výrazně nižší. Ovšem výhodou bakterií *Geobacillus* je kultivace ve vyšších teplotách, díky čemuž se snižuje rozpustnost kyslíku, a tím může dojít ke snazšímu spuštění syntézy laktátu. Další výhodou jsou nepříliš striktní podmínky na sterilitu.



Obrázek 18: Produkce kyseliny mléčné za anaerobních podmínek na minerálním médiu 1

Nejlepších výsledků bylo dosaženo u bakterií *G. thermocatenulatus* (G5, 10,0 g/l), *G. thermodenitrificans* (G6, 15,0 g/l) a *G. thermoglucosidasius* (G7, 11,2 g/l) (Obrázek 18). Tyto kmeny můžeme považovat za potenciálně velice slibné producenty laktátu. Naopak nejnižší výtěžky byly zaznamenány u bakterií *S. thermophilus* (G1), *G. uzenensis* (G8) a *G. zalihae* (G12), jelikož pravděpodobně upřednostňují aerobní metabolismus.



Obrázek 19: Produkce kyseliny mléčné za aerobních podmínek na minerálním médiu 1

Mikrobiální produkce kyseliny mléčné probíhá za anaerobních podmínek. Z tohoto důvodu, jak je patrné z obrázku 19, nedošlo při kultivaci bakterií za aerobních podmínek k produkci kyseliny mléčné nebo naprosto v minimálním množství, což pravděpodobně souvisí s nedokonalou distribucí kyslíku v kultivačním médiu.

4.1.6 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální látky přírodního původu jsou v dnešní době hojně využívány. S jejich uplatněním se můžeme setkat v kosmetickém průmyslu, medicíně, farmacii a v neposlední řadě také v potravinářském průmyslu. Nejčastěji jsou využívány jako konzervační prostředky pro zajištění trvanlivosti produktu. Velký důraz na výzkum je také kladen v souvislosti se stále zvyšující se rezistencí bakterií vůči již známým antibiotikům. U řady zástupců rodu *Geobacillus* již byla produkce antimikrobiálních látek identifikovaná a popsána. Například bakterie *G. toebii* produkuje toebicin a bakteriocin a druh *G. thermodenitrificans* geobacillin I [97, 98]. Novotny a Perry [64] popsali produkci antimikrobiálních látek thermoleovorinů bakterií *G. thermoleovorans*. Dle autorů Garg a Tang [97] se predikce schopnosti produkce antimikrobiálních látek přesouvá k analýze genomu.

Antimikrobiální aktivita bakterií rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus* byla stanovena pomocí standardizovaného bujónového dilučního testu. Supernatanty byly nejprve testovány při nižší koncentraci. Pokud nebyla prokázána antimikrobiální aktivita, byl test opakován s větším množstvím supernatantu. Intenzita poklesu či nárůst buněk je uvedena v tabulce 25.

Tabulka 25: Stanovení antimikrobiální aktivity bakterií rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*

	<i>E. coli</i>		<i>S. marcescens</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>M. luteus</i>	
	150 µl/ 50 µl	100 µl/ 100 µl	150 µl/ 50 µl	100 µl/ 100 µl	150 µl/ 50 µl	100 µl/ 100 µl	150 µl/ 50 µl	100 µl/ 100 µl
G1								
G2								
G3								
G5								
G8								
G9								
G10								
G11								
G12								
G13								
G14								

Inhibice	0-20 %	21-40 %	41-60 %	61-80 %
----------	--------	---------	---------	---------

Podpora růstu	0-50 %	51-100 %
------------------	--------	----------

Při nižším množství supernatantu byly úspěšně prokázány antimikrobiální účinky pouze u bakterií rodu *Geobacillus* kromě *G. jurassicus* (G2) proti gram-negativní bakterii *Escherichia coli*. Při zvýšení koncentrace supernatantu se antimikrobiální účinky projevíly také proti gram-pozitivním bakteriím *Staphylococcus epidermidis* a *Micrococcus luteus*. Přičemž byla opět negativní odezva od *G. jurassicus* (G2), kromě účinku proti *E. coli*. Bakterie *S. thermophilus* (G1) neprokázala antimikrobiální účinky proti žádnému z modelových kmenů ani při nižší, ani při vyšší koncentraci.

4.1.7 Screening produkce polyhydroxyalkanoátů

Plasty jsou jedním z nejpoužívanějších obalových materiálů na světě. Vzhledem k jejich obrovskému množství se staly zásadním problémem při ochraně životního prostředí. Hlavním problémem je jejich odbouratelnost. V přírodě se mohou rozkládat až stovky let. Alternativou jsou plasty produkované pomocí mikroorganismů. Vhodnou variantou jsou polyhydroxyalkanoáty, jelikož jsou plně degradabilní a lze je syntetizovat z obnovitelných zdrojů. Značnou nevýhodou jsou jejich stále vysoké výrobní náklady. Z toho důvod se neustále hledají způsoby, jak tyto náklady snížit. Jednou z těchto možností je použití termofilních mikroorganismů [98].

Zkoumané mikroorganismy byly testovány na přítomnost *phaC* genu kódující PHA syntázu. Tedy byla ověřována schopnost produkce polyhydroxyalkanoátů na úrovni genotypu.

Pouze u několika zástupců bakterií rodu *Geobacillus*, a to u *G. thermocatenulatus* (G5), *G. gargensis* (G9), *G. thermoleovorans* (G10), *G. zalihae* (G12) a *G. lituanicus* (G13) byla prokázána přítomnost *phaC* genu (551 bp). U ostatních bakterií byl prokázán pouze gen *16S* rRNA, který je typický pro bakterie a slouží k taxonomickému zařazení. Syntáza I. třídy nebyla potvrzena.

Na základě prokázané přítomnosti *phaC* genu u některých bakterií byla provedena kultivace za účelem získání polyhydroxyalkanoátů. Analýza byla provedena pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem. I když schopnost produkce PHA je mezi zástupci příbuzných rodů častá, v námi testované biomase nebyly detekovány žádné polyhydroxyalkanoáty. Giedraitytė a kolektiv [98] byli schopni vyprodukovat pomocí kmenu *Geobacillus* sp. AY 946034 68,9 % polyhydroxyalkanoátů z celkové sušiny. Vijay a Tarika [99] dosáhli nejvyšší produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí kmenu *G. stearothermophilus* R-35646 až 84,6 % z celkové sušiny. V obou případech byly striktně regulovány podmínky kultivace, což v našem případě nebylo cílem, vzhledem ke snaze vytvořit celkový přehled biotechnologického potenciálu. Jedním z důvodů tedy mohou být nevyhovující podmínky při kultivaci, které byly nastaveny pro celý screening. Pravděpodobně došlo k upřednostnění metabolismu produkující například biosurfaktanty či kyselinu octovou. Produkce polyhydroxyalkanoátů je závislá také na poměru uhlíku a dusíku, z čehož vyplývá, že v našem případě nebyl tento poměr dodržen.

4.2 Screening biotechnologického potenciálu přírodních izolátů rodu *Bacillus*

Mikrobiální produkce není průmyslově zdaleka plně využívána. Ve většině případů tomu brání vysoké náklady. Z tohoto důvodu je neustálá snaha objevovat vhodné nové produkční kmeny z přirozeného prostředí. Díky neustálým adaptacím mikroorganismům k měnícím se podmínkám je možné objevit kmen s netušenými možnostmi.

Bakterie použité v této části práce byly v rámci paralelně řešené disertační práce získány jako přírodní izoláty z kalu čistírny odpadních vod v Modřicích. Po provedení sekvenace bylo zjištěno, že se jedná o bakterie rodu *Bacillus*, konkrétně *Bacillus amyloliquefaciens* a *Bacillus licheniformis*. Ještě donedávna byly součástí tohoto rodu také bakterie rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*. Pro zjištění jejich schopností byly podrobeny stejnému screeningu biotechnologického potenciálu jako sbírkové kmeny rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*.

4.2.1 Schopnost utilizace uhlíkatých zdrojů

Bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25) a *Bacillus licheniformis* (31) byly podrobeny testu na schopnost utilizace uhlíkatých zdrojů jak sacharidových (Tabulka 26), tak nesacharidových (Tabulka 27). Bakterie prokázaly schopnost růstu na všech zkoumaných substrátech.

Tabulka 26: Schopnost utilizace sacharidových uhlíkatých zdrojů bakteriemi *Bacillus licheniformis* a *Bacillus amyloliquefaciens*

	25	31
glukóza	intenzivní	střední
laktóza	minimální	intenzivní
xylóza	minimální	intenzivní
sacharóza	střední	střední
fruktóza	minimální	minimální
škrob	minimální	střední
maltóza	minimální	minimální
arabinóza	minimální	minimální
mannitol	střední	střední
galaktóza	minimální	minimální
karboxymethylcelulóza	minimální	intenzivní
celobióza	minimální	intenzivní
rhamnóza	minimální	minimální
ribóza	minimální	minimální
manóza	minimální	střední
sorbitol	minimální	intenzivní
manit	minimální	minimální























- bez nárůstu
- minimální nárůst







- střední nárůst
- intenzivní nárůst

U bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25) byl největší nárůst pozorován u kultivace na glukóze. Zvýšený růst byl zaznamenán na sacharóze a mannitolu. Kmen *Bacillus licheniformis* (31) vykazoval zvýšený růst na stejných uhlíkatých zdrojích jako *Bacillus amyloliquefaciens* (25), ovšem nejintenzivnější nárůst byl pozorován na laktóze, xylóze, celobióze a sorbitolu.

Tabulka 27: Schopnost utilizace nesacharidových uhlíkatých zdrojů bakteriemi *Bacillus licheniformis* a *Bacillus amyloliquefaciens*

	25	31
ethylacetát		
propionát sodný		
kyselina levulová		
γ -butyrolakton		
xylan		
1,4-butandiol		
kasein		
kyselina valerová		
propan-1-ol		
glycerol		

	- bez nárůstu		- střední nárůst
	- minimální nárůst		- intenzivní nárůst

Při kultivaci na nesacharidových uhlíkatých zdrojích bylo nejintenzivnějšího nárůstu kultury dosaženo u bakterie *Bacillus licheniformis* (31), přičemž uhlíkatými zdroji byly xylan a glycerol. Střední nárůst vykazovaly substráty jako ethylacetát, propionát sodný, γ -butyrolakton, 1,4-butandiol, kasein a glycerol. Na zbývajících substrátech (kyselina levulová, kyselina valerová a propan-1-ol) byl nárůst minimální. U bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* byl vyšší nárůst zaznamenán při kultivaci na ethylacetátu, xylanu a kaseinu. Růst na ostatních substrátech byl nižší.

Nespornou výhodou schopnosti utilizovat širokou škálu uhlíkatých zdrojů je možnost využití odpadních látek například z potravinářského průmyslu jako substrát pro kultivaci mikroorganismů. Použitím odpadních substrátů v průmyslu lze snížit výslednou cenu mikrobiální produkce.

4.2.2 Screening produkce biosurfaktantů

Jak již bylo zmíněno, biosurfaktanty se jeví jako slibná náhrada synteticky vyráběných povrchově aktivních látek. Screening produkce biosurfaktantů byl proveden pomocí tří metod, a to solubilizace krystalického anthracenu, stanovení emulgační aktivity a metody du-Noüy-Ring, stejně jako u sbírkových bakterií *Geobacillus* a *Saccharococcus*.

Tabulka 28: Stanovení biosurfaktantů produkovaných *B. amyloliquefaciens* (25) a *B. licheniformis* (31) – solubilizace krystalického anthracenu

zdroj uhlíku	25 [-]	31 [-]	PK [-]
glukóza	0,825	0,327	1,436
glycerol	0,511	0,756	1,546

Pomocí solubilizace krystalického anthracenu byla ověřena přítomnost biosurfaktantů. Ve srovnání s pozitivní kontrolou byly získané výsledky testovaných kmenů výrazně nižší (Tabulka 28). Vyšší koncentrace povrchově aktivních látek bylo dosaženo u bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25) při kultivaci s glukózou jako uhlíkatým zdrojem. Naopak u kmenu *Bacillus licheniformis* (31) bylo větší množství surfaktantů potvrzeno při kultivaci s glycerolem. Vyšší produkce biosurfaktantů na glukóze či glycerolu pravděpodobně závisí na metabolismu zkoumaných bakterií. Již ze screeningu uhlíkatých zdrojů bylo patrné, že glukóza lépe prospívá kmenu *Bacillus amyloliquefaciens* (25), zatímco glycerol kmenu *Bacillus licheniformis* (31).

Tabulka 29: Stanovení biosurfaktantů *B. amyloliquefaciens* (25) a *B. licheniformis* (31) – stanovení emulgační aktivity

zdroj uhlíku	25 [%]	31 [%]	PK [%]
glukóza	9,6	16,4	54,2
glycerol	0	0	56,4

Při testování kultivací probíhajících na glycerolu nebyla vytvořená žádná emulgovaná vrstva ani u kmenu *Bacillus amyloliquefaceins* (25) ani u *Bacillus licheniformis* (31). Pouze při kultivaci s glukózou byla prokázána přítomnost biosurfaktantů podílejících se na tvorbě a udržení stabilní emulgované vrstvy, ale oproti pozitivní kontrole ve velmi malém množství (Tabulka 29). U bakterie *Bacillus licheniformis* (31) tvořil emulgační index 16,4 % a u bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25) pouze 9,6 %.

Tabulka 30: Stanovení biosurfaktantů *B. amyloliquefaciens* (25) a *B. licheniformis* (31) – metoda du-Noüy-Ring

zdroj uhlíku	25 [mN/m]	31 [mN/m]	M [mN/m]	PK [mN/m]
glukóza	47,4	49,3	56,3	32,0
glycerol	48,6	45,5	52,6	32,2

U metody du-Noüy-Ring je optimální snížit hodnotu povrchového napětí na 40 mN/m a méně. V případě bakterií *Bacillus licheniformis* (25) a *Bacillus amyloliquefaceins* (31) nebylo této hranice dosaženo. Hodnota povrchového napětí se u testovaných supernatantů pohybovala v rozmezí 45,5-49,3 mN/m (Tabulka 30). Vztáhneme-li tato data k naměřeným hodnotám čistého média (M), můžeme pozorovat mírné snížení povrchového napětí.

4.2.3 Screening produkce hydrolytických enzymů

Screening produkce hydrolytických enzymů byl proveden totožným způsobem jako v případě bakterií rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus*. Bakterie byly testovány na schopnost produkce proteáz, amyláz, lipáz, celuláz a xylanáz. Tyto schopnosti jsou přehledně uvedeny v tabulce 31. Bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25) prokázala schopnost produkovat kromě amyláz všechny testované enzymy. U bakterie *Bacillus licheniformis* (31) byla potvrzena přítomnost enzymatického aparátu pro produkci proteáz, celuláz a xylanáz. Produkce proteáz byla již u jiného kmene *B. licheniformis* popsána a také je tato bakterie komerčně využívána pro produkci alkalických proteáz – alkaláz [100]. Vzhledem k potvrzení této produkce u našeho

přírodního izolátu, by bylo vhodné pokračovat v dalším výzkumu a potvrdit, či vyvrátit, zda se jedná o potencionálního producenta.

Tabulka 31: Schopnost produkce hydrolytických enzymů bakteriemi *Bacillus amyloliquefaciens* (25) a *licheniformis* (31)

	proteázy	amylázy	lipázy	celulázy	xylanázy
25					
31					



- produkce nepotvrzena

- produkce potvrzena

4.2.4 Screening produkce organických kyselin

V přírodních izolátech *Bacillus amyloliquefaciens* (25) a *Bacillus licheniformis* (31) bylo stanoveno množství vyprodukovaných organických kyselin, konkrétně kyseliny octové a kyseliny mléčné pomocí iontové chromatografie s vodivostním detektorem.

Tabulka 32: Stanovení produkce kyseliny octové bakteriemi *Bacillus amyloliquefaciens* (25) a *B. licheniformis* (31)

zdroj uhlíku	25 [g/l]	31 [g/l]
glukóza	0,22	0,27
glycerol	1,17	0,88

Množství produkované kyseliny octové (Tabulka 32) se v případě kultivace s glukózou jako uhlíkatým zdrojem nedostalo přes 0,3 g/l. Při kultivaci s glycerolem bylo dosaženo vyšších hodnot, přičemž bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25) byla schopna vyprodukovat 1,17 g/l kyseliny octové a bakterie *Bacillus licheniformis* (31) pouze 0,88 g/l.

Tabulka 33: Stanovení produkce kyseliny mléčné bakteriemi *Bacillus amyloliquefaciens* (25) a *licheniformis* (31)

zdroj uhlíku	25 [g/l]	31 [g/l]
glukóza	0,02	0,01
glycerol	0,06	0,04

Vzhledem k tomu, že prováděné kultivace probíhaly za aerobních podmínek, byl předpoklad obsahu kyseliny mléčné minimální až žádný, což nám analýza potvrdila (Tabulka 33). U bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25) bylo množství kyseliny mléčné při kultivaci s glukózou jako substrátem 0,02 g/l a při kultivaci s glycerolem jako uhlíkatým zdrojem 0,06 g/l. Hodnoty u bakterie *Bacillus licheniformis* byly obdobné. Při kultivaci s glukózou byl výtěžek kyseliny mléčné stanoven na 0,01 g/l a při kultivaci s glycerolem na 0,04 g/l.

4.2.5 Stanovení antimikrobiální aktivity

Stanovení antimikrobiálních látek bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 3.8. Supernatanty byly testovány proti dvěma gram-negativním kmenům (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) a dvěma gram-pozitivním kmenům (*Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*). Antimikrobiální účinek byl zjištěn pouze proti kmenu *Micrococcus luteus* při vyšší koncentraci supernatantu (Tabulka 34). Bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25) byla schopna snížit růst gram-pozitivní bakterie o téměř 15 % a bakterie *Bacillus licheniformis* (31) o 32,5 %.

Tabulka 34: Stanovení antimikrobiální aktivity bakterií *B. amyloliquefaciens* (25) a *B. licheniformis* (31)

	<i>E. coli</i>		<i>S. marcescens</i>	
	150 µl/ 50 µl	100 µl/ 100 µl	150 µl/ 50 µl	100 µl/ 100 µl
25				
31				
	<i>S. epidermidis</i>		<i>M. luteus</i>	
	150 µl/ 50 µl	100 µl/ 100 µl	150 µl/ 50 µl	100 µl/ 100 µl
25				
31				

pokles	0-20 %	21-40 %	41-60 %	61-80 %
--------	--------	---------	---------	---------

nárůst	0-50 %	51-100 %
--------	--------	----------

4.2.6 Screening produkce polyhydroxyalkanoátů

Při produkci polyhydroxyalkanoátů byl sledován vliv použitého uhlíkatého substrátu. Jak při kultivaci bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* (25), tak při kultivaci bakterie *Bacillus licheniformis* (31) byl získán značně rozdílný výtěžek. Zatímco *Bacillus amyloliquefaciens* (25) lépe produkoval polyhydroxyalkanoáty na glukózovém substrátu, *Bacillus licheniformis* (31) produkoval výrazně vyšší množství při kultivaci na glycerolu (Tabulka 35). Vliv použitého substrátu byl tedy zásadní. Díky těmto získaným výsledkům se tito zástupci rodu *Bacillus* jeví jako slibní producenti PHA.

Tabulka 35: Stanovení biomasy a obsahu PHA v sušině bakterií *Bacillus amyloliquefaciens* (25) a *Bacillus licheniformis* (31)

zdroj uhlíku	25		31	
	biomasa [g/l]	PHA [%]	biomasa [g/l]	PHA [%]
glukóza	2,79 ± 0,18	54,83 ± 5,43	2,25 ± 0,16	1,42 ± 0,12
glycerol	0,68 ± 0,40	1,10 ± 0,04	3,37 ± 0,21	62,03 ± 4,35

5 ZÁVĚR

Termofilní mikroorganismy mají v průmyslových procesech neustále větší zastoupení. Jejich neochvějnou výhodou je produkce termostabilních metabolitů, zejména enzymů. Díky kultivaci při vyšších teplotách dochází k inaktivaci nebo dokonce eliminaci kontaminantů, především patogenních mezofilních mikroorganismů. Dále se zvyšuje rozpustnost většiny chemikálií, či se zvyšuje reakční rychlosti. Jedním ze zajímavých zástupců termofilů jsou bakterie rodu *Geobacillus*, *Saccharococcus* a *Bacillus*.

Z tohoto důvodu se staly předmětem této práce, jejímž cílem byla základní metabolická charakterizace vybraných zástupců rodu již zmíněných rodů a ověření potenciálu pro produkci průmyslově využitelných metabolitů – polyhydroxyalkanoátů, biosurfaktantů, organických kyselin, antimikrobiálních látek a extracelulárních hydrolytických enzymů, konkrétně proteáz, amyláz, lipáz, celuláz a xylanáz.

Nejprve bylo vybráno univerzální minerální médium využívané během celého screeningu biotechnologického potenciálu s obměnou uhlíkatého zdroje. Ze čtyř testovaných médií vykazovalo největší nárůst biomasy minerální médium s označením 1.

Screening schopnosti utilizace uhlíkatých zdrojů byl testován na šestnácti sacharidových a deseti nesacharidových substrátech. Kmeny *G. thermocatenulatus*, *G. teobii*, *G. zalihae* a zástupci rodu *Bacillus* byly schopny využít všechny sacharidové zdroje. Jako univerzální sacharidy se jevily glukóza, laktóza, sacharóza, manóza, a sorbitol. Kmeny *Bacillus amyloliquefaciens* a *Bacillus licheniformis* opět dokázaly růst na všech zkoumaných nesacharidových substrátech. V případě rodu *Geobacillus* došlo k utilizaci daných uhlíkatých zdrojů téměř všemi vybranými zástupci. Vzhledem k schopnosti využít různé zdroje uhlíku, lze předpokládat, že budou testované bakterie využívat i levné odpadní substráty z potravinářského průmyslu.

Biosurfaktanty se jeví jako vhodná alternativa k synteticky vyráběným povrchově aktivním látkám. Pro stanovení biosurfaktantů existuje řada spolehlivých metod. V této práci bylo využito stanovení pomocí solubilizace krystalického anthracenu, stanovení emulgační aktivity a metody du-Noüy-Ring. Každá z uvedených metod se zabývá jinými vlastnostmi biosurfaktantů, z čehož vyplývá, že nelze jednoznačně určit nejlepšího producenta biosurfaktantů. Hodnot srovnatelných s pozitivní kontrolou při stanovení solubilizace krystalického anthracenu dosáhly produkce bakterií *S. thermophilus* a *G. subterraneus*. Biosurfaktanty odpovědné za tvorbu a udržení stabilní emulgované vrstvy v nejvyšší míře produkovaly kmeny *G. teobii* a *G. zalihae*. U metody du-Noüy-Ring je pomyslnou hranicí dosažení hodnoty povrchového napětí 40 mN/m a méně. Tuto hranici byly schopny pokořit pouze produkce kmenů *S. thermophilus* a *G. thermoleovorans*. Bakterie rodu *Bacillus* nebyly schopny v produkci biosurfaktantů konkurovat rodům *Geobacillus* a *Saccharococcus*.

Po termostabilních enzymech je na trhu stále vzrůstající poptávka. Z tohoto důvodu bylo nasnadě otestovat predispozice k produkci extracelulárních hydrolytických enzymů. Konkrétně byly zkoumány proteázy, amylázy, lipázy, celulázy a xylanázy. Všichni vybraní zástupci rodu *Geobacillus* a *Saccharococcus* prokázali schopnost produkce lipolytických enzymů. Pouze u bakterií *G. jurassicus*, *G. uzenensis* a *G. lituanicus* byl shledán enzymatický aparát pro všechny testované enzymy.

Organické kyseliny představují skupinu rozličných sloučenin. Z tohoto důvodu nalézají také široké uplatnění v průmyslových odvětvích. Velkou roli hrají v potravinářství jako konzervační látky pro zvýšení udržitelnost výrobků. Tyto vlastnosti také vykazují kyselina mléčná a octová jež byly součástí screeningu. Nejvyšší výtěžnost kyseliny mléčné bylo dosaženo pomocí bakterií *G. thermocatenulatus*, *G. thermodenitrificans* a *G. thermoglucosidasius* až 15 g/l. V případě kyseliny octové nebylo dosaženo zdaleka tak vysokých hodnot. Nejvyšší koncentrace dosáhla produkce kmenu *G. jurassicus*, a to 1,2 g/l.

Dalším zkoumaným metabolitem byly antimikrobiální látky, jež jsou hojně využívány ve farmacii, medicíně, kosmetickém průmyslu a v neposlední řadě také v potravinářství. Antimikrobiální aktivita byla testována proti gram-pozitivním kmenům *Staphylococcus epidermidis* a *Micrococcus luteus* a gram-negativním kmenům *Escherichia coli* a *Serratia marcescens*. Při nižší koncentraci antimikrobiálních látek produkováných zástupci rodu *Geobacillus* se účinky projevíly pouze proti *E. coli*. Při zvýšení koncentrace byly antimikrobiální účinky zaznamenány také proti gram-pozitivním bakteriím *S. epidermidis* a *M. luteus*. V případě kmenu *S. thermophilus* nebyl prokázán žádný antimikrobiální efekt. Kmeny *B. amyloliquefaciens* a *B. licheniformis* byly schopny snížit růst pouze gram-pozitivních bakterií *M. luteus* při vyšší koncentraci antimikrobiálních látek.

Posledním testovaným metabolitem byly mikrobiální polymery – polyhydroxyalkanoáty, jejichž výzkum rapidně roste vzhledem k potenciálu nahrazení části syntetických polymerů zatěžujících životní prostředí. Nicméně v případě bakterií rodu, *Geobacillus* a *Saccharococcus* byl za daných podmínek kultivace potenciál produkce polyhydroxyalkanoátů minimální nebo vůbec žádný. Jako potenciální producenti se jeví vybraní zástupci rodu *Bacillus*, kde obsah polyhydroxyalkanoátů tvořil až 60 % sušiny.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MACELROY, R.D. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*. 1974, **6**(1), 74-75. DOI: 10.1016/0303-2647(74)90026-4. ISSN 03032647. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0303264774900264>
- [2] URBIETA, M. S., E. R. DONATI, K. G. CHAN, S. SHAHAR, L. L. SIN a K. M. GOH. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances*. 2015, **33**(6), 633-647. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.007. ISSN 07349750. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975015000725>
- [3] NAZINA, T. N., A. M. LYSENKO, V. V. PETRUNYAKA, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001, **51**(2), 433-446. DOI: 10.1099/00207713-51-2-433. ISSN 1466-5026. Dostupné také z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-2-433>
- [4] SCHIRALDI, C. a M. DE ROSA. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *TRENDS in Biotechnology*. 2002, **20**(12).
- [5] ROTHSCILD, L. J. a R. L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature*. 2005, **409**, 1092-1101.
- [6] COWAN, D. A., J. B. RAMOND, T. P. MAKHALANYANE a P. D. E. MAAYER. Metagenomics of extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*. 2015, **25**, 97-102. DOI: 10.1016/j.mib.2015.05.005. ISSN 13695274.
- [7] SINGH, O. V. Extremophiles: sustainable resources and biotechnological implications. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2013. ISBN 978-1-118-10300-5.
- [8] ALLERS, T. a M. MEVARECH. Archaeal genetics – the third way. *Nature Reviews Genetics*. 2005, **6**, 58-73.
- [9] HUBER, H., M. J. HOHN, K. O. STETTER a R. RACHEL. The phylum Nanoarchaeota: Present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Research in Microbiology*. 2003, **154**(3), 165-171. DOI: 10.1016/S0923-2508(03)00035-4. ISSN 09232508.
- [10] BULT, C. J., O. WHITE, G. J. OLSEN, et al. Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*. 1996, **273**(5278), 1058-1073. DOI: 10.1126/science.273.5278.1058. ISSN 0036-8075.
- [11] LENTZEN, G. a T. SCHWARZ. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, **72**(4), 623-634. DOI: 10.1007/s00253-006-0553-9. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0553-9>

- [12] RADDADI, Noura, Ameer CHERIF, Daniele DAFFONCHIO, Mohamed NEIFAR a Fabio FAVA. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, **99**(19), 7907-7913. DOI: 10.1007/s00253-015-6874-9. ISSN 0175-7598.
- [13] BEFFA, Trello, Michel BLANC, Pierre-Francois LYON, Gudrun VOGT, Marcello MARCHIANI, Johanna Lott FISCHER a Michel ARGANO. Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80 °C). *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, **62**(5), 1723-1727.
- [14] ARAGNO, M., KRISTJANSSON, J. K., ed. Aerobic, chemolithoautotrophic, thermophilic bacteria. *Thermophilic Bacteria*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1992, 77-103.
- [15] STETTER, K. O. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*. 1999, **452**(1-2), 22-25. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00663-8. ISSN 00145793. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(99\)00663-8](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(99)00663-8)
- [16] MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO aj. PARKER. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall/Pearson Education, 2003. ISBN 978-013-0662-712.
- [17] TRIVEDI, S., H. S. GEHOLT a S. R. RAO. Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genetics and Molecular Research*. 2006, **5**(4), 816-827.
- [18] VASILJEVIC, T. a P. JELEN. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2001, **2**(2), 75-85. DOI: 10.1016/S1466-8564(01)00027-3. ISSN 14668564. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856401000273>
- [19] SEDLÁČEK, I. Taxonomie prokaryot. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [20] VARMA, P. *Bacillus amyloliquefaciens*. *Alchetron* [online]. 2018 [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://alchetron.com/Bacillus-amyloliquefaciens>
- [21] DE BOER, A. S., F. PRIEST a B. DIDERICHSEN. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1994, **40**(5), 595-598. DOI: 10.1007/BF00173313. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00173313>
- [22] PRIEST, F. G. Products and Applications. *Bacillus*. Boston, MA: Springer US, 1989, 293-320. DOI: 10.1007/978-1-4899-3502-1_11. ISBN 978-1-4899-3504-5. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-3502-1_11
- [23] CRIPPS, R. E., K. ELEY, D. J. LEAK, et al. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metabolic Engineering*. 2009, **11**(6), 398-408. DOI: 10.1016/j.ymben.2009.08.005. ISSN 10967176. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717609000688>
- [24] ANURADH, D., I. DARAH, A. R. RASHIDAH a F. A. A. RASHID. Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. *Enzyme Research*. 2012, **2012**, 1-7. DOI:

- 10.1155/2012/987523. ISSN 2090-0406. Dostupné také z:
<http://www.hindawi.com/journals/er/2012/987523/>
- [25] DE CHAMPDORÉ, M., M. STAIANO, M. ROSSI a S. D'AURIA. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *Journal of The Royal Society Interface*. 2007, **4**(13), 183-191. DOI: 10.1098/rsif.2006.0174. ISSN 1742-5689. Dostupné také z:
<http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2006.0174>
- [26] TAYLOR, M. P., K. L. ELEY, S. MARTIN, M. I. TUFFIN, S. G. BURTON a D. A. COWAN. Thermophilic ethanogenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in Biotechnology*. 2009, **27**(7), 398-405. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.03.006. ISSN 01677799. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779909000894>
- [27] PERFUMO, A., I. M. BANAT, R. MARCHANT a L. VEZZULLI. Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Chemosphere*. 2007, **66**(1), 179-184. DOI:
 10.1016/j.chemosphere.2006.05.006. ISSN 00456535. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653506006047>
- [28] DELEON-RODRIGUEZ, N., T. L. LATHEM, L. M. RODRIGUEZ-R, et al. Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, **110**(7), 2575-2580. DOI: 10.1073/pnas.1212089110. ISSN 0027-8424. Dostupné také z:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1212089110>
- [29] ZEIGLER, D. R. The Geobacillus paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet. *Microbiology*. 2014, **160**(Pt_1), 1-11. ISSN 1350-0872. Dostupné také z:
<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.071696-0>
- [30] WANG, L., Y. TANG, S. WANG, R. L. LIU, M. Z. LIU, Y. ZHANG, F. L. LIANG a L. FENG. Isolation and characterization of a novel thermophilic Bacillus strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles*. 2006, **10**(4), 347-356. DOI: 10.1007/s00792-006-0505-4. ISSN 1431-0651. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s00792-006-0505-4>
- [31] DEFLAUN, M. F., J. K. FREDRICKSON, H. DONG, et al. Isolation and characterization of a Geobacillus thermoleovorans strain from an ultra-deep South African gold mine. *Systematic and Applied Microbiology*. 2007, **30**(2), 152-164. DOI: 10.1016/j.syapm.2006.04.003. ISSN 07232020. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202006000580>
- [32] BARTHOLOMEW, J. W. a G. PAIK. Isolation and Identification of Obligate Thermophilic Sporeforming Bacilli from Ocean Basin Cores. *Journal of Bacteriology*. 1966, **92**(3), 635-638.
- [33] NYSTRAND, R. Saccharococcus thermophilus gen. nov., sp. nov. Isolated from Beet Sugar Extraction. *Systematic and Applied Microbiology*. 1984, **5**(2), 204-219. DOI: 10.1016/S0723-2020(84)80021-1. ISSN 07232020. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202084800211>

- [34] FORTINA, M. G., D. MORA, P. SCHUMANN, C. PARINI, P. L. MANACHINI a E. STACKEBRANDT. Reclassification of *Saccharococcus caldxylosilyticus* as *Geobacillus caldxylosilyticus* (Ahmad et al. 2000) comb. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2001, **51**(6), 2063-2071. DOI: 10.1099/00207713-51-6-2063. ISSN 1466-5026. Dostupné také z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-6-2063>
- [35] VERLINDEN, R. A. J., D. J. HILL, M. A. KENWARD, C. D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, **102**(6), 1437-1449. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- [36] BRAUNEGG, G., G. LEFEBVRE a K. F. GENSER. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Biotechnol.* 1998, **65**(2-3), 127-161.
- [37] REDDY, C. S. K, R. GHAI, RASHMI a V. C. KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003, **87**(2), 137-146. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [38] FLICKINGER, M. C. a S. W. DREW. The encyclopedia of bioprocess technology: *fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley, 1999. ISBN 04-711-3822-3.
- [39] SHANG, L., M. JIANG a H. N. CHANG. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutrophaw* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnology Letters*. **25**(17), 1415-1419. DOI: 10.1023/A:1025047410699. ISSN 01415492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1025047410699>
- [40] CHEN, G. Q., I. HAJNAL, H. WU, L LV a J. YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology*. 2015, **33**(10), 565-574. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.007. ISSN 01677799. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915001596>
- [41] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [42] WANG, H., X. LI a G. CHEN. Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a fadBA knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. putida* KT2442. *Process Biochemistry*. 2009, **44**(1), 106-111. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.09.014. ISSN 13595113. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951130800295X>
- [43] REHM, B. H. A. a A. STEINBÜCHEL. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International*

- Journal of Biological Macromolecules*. 1999, **25**(1-3), 3-19. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00010-0. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813099000100>
- [44] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*. 2014, **8**(11), 791-808. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618X.
- [45] LIM, J., M. YOU, J. LI a Z. LI. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, **79**, 917-929. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.132. ISSN 09284931. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117315357>
- [46] ALI, I. a N. JAMIL. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Frontiers in Biology*. 2016, **11**(1), 19-27. DOI: 10.1007/s11515-016-1389-z. ISSN 1674-7984. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11515-016-1389-z>
- [47] YIN, H., J. QIANG, Y. JIA, J. YE, H. PENG, H. QIN, N. ZHANG a B. HE. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry*. 2009, **44**(3), 302-308. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.11.003. ISSN 13595113. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511308003565>
- [48] MAKKAR, R. S. a K. J. ROCKNE. Comparison of Synthetic Surfactants and Biosurfactants in Enhancing Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003, **22**(10), 02-472. DOI: 10.1897/02-472. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1897/02-472>
- [49] FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology*. 1992, **10**, 208-217. DOI: 10.1016/0167-7799(92)90215-H. ISSN 01677799. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016777999290215H>
- [50] MOHAN, P. K., G. NAKHLA a E. K. YANFUL. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*. 2006, **40**(3), 533-540. DOI: 10.1016/j.watres.2005.11.030. ISSN 00431354. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135405006755>
- [51] DESAI, J. D. a I. M. BANAT. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997, **61**(1), 47-64.
- [52] KOSARIC, N. Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation. *Food Technology, Biotechnology*. 2001, **39**(4), 295-304. ISSN 1330-9862.
- [53] SIÑERIZ, F., HOMMEL, R. K., KLEBER, H. P. Production of biosurfactants. *Encyclopedia of Life Support Systems*. Paris: Eolss, 2001.
- [54] MAKKAR, R. S. a K. J. ROCKNE. Comparison of Synthetic Surfactants and Biosurfactants in Enhancing Biodegradation of Polycyclic Aromatic

- Hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003, **22**(10), 02-472. DOI: 10.1897/02-472. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1897/02-472>
- [55] DEHGHAN-NOUDEH, G., M. HOUSAINDOKHT a B. S. F. BAZZAZ. Isolation, characterization and investigation of surface and hemolytic activities of lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Journal of Microbiology*. 2005, **43**(3), 272-276.
- [56] SABATÉ, D. C., L. CARRILLO a M. C. AUDISIO. Inhibition of *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Research in Microbiology*. 2009, **160**(3), 193-199. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.03.002. ISSN 09232508. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250809000242>
- [57] KITAMOTO, Dai, Hiroko ISODA a Tadaatsu NAKAHARA. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, **94**(3), 187-201. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80149-9. ISSN 13891723. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172302801499>
- [58] RODRIGUES, L., H. C. VAN DER MEI, J. TEIXEIRA a R. OLIVEIRA. Influence of Biosurfactants from Probiotic Bacteria on Formation of Biofilms on Voice Prostheses. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, **70**(7), 4408-4410. DOI: 10.1128/AEM.70.7.4408-4410.2004. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.70.7.4408-4410.2004>
- [59] GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in Pharmaceutical Industry. *American Journal of Drug Discovery and Development*. 2010. ISSN 215-427x.
- [60] DIBNER, J. J. a P. BUTTIN. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism¹. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2002, **11**(4), 453-463. DOI: 10.1093/japr/11.4.453. ISSN 1056-6171. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/japr/article-lookup/doi/10.1093/japr/11.4.453>
- [61] NAIDU, A. S. *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton: CRC Press, 2000, 818 s. ISBN 08-493-2047-X.
- [62] POKUSAEVA, K., N. KUISIENE, D. JASINSKYTE, K. RUTIENE, J. SALEIKIENE a D. CHITAVICHUS. Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. *Open Life Sciences*. 2009, **4**(2). DOI: 10.2478/s11535-009-0009-1. ISSN 2391-5412. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/biol.2009.4.issue-2/s11535-009-0009-1/s11535-009-0009-1.xml>
- [63] MARTIRANI L., VARCAMONTI M., NACLERIO G., DE FELICE M., Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*, *Microb. Cell Fact.*, 2002, 1-5.

- [64] NOVOTNY J. F., PERRY J. J. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. *Appl Environ Microbiol.* 1992, 58(8), 2393-6.
- [65] SHAFIA F. Thermocins of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology.* 1966, 92(2), 524-5.
- [66] DELVES-BROUGHTON, J., P. BLACKBURN, R. J. EVANS a J. HUGENHOLTZ. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1996, **69**(2), 193-202. DOI: 10.1007/BF00399424. ISSN 0003-6072. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00399424>
- [67] HAKI, G. a S. RAKSHIT. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology.* 2003, 89, 17-34.
- [68] HUSSEIN, A. H., B. K. LISOWSKA a D. J. LEAK. *The Genus Geobacillus and Their Biotechnological Potential.* Elsevier, 2015, Advances in Applied Microbiology. DOI: 10.1016/bs.aambs.2015.03.001. ISBN 9780128022498. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216415000064>
- [69] BRONSCHEUER, T. U., C. BESSLER, R. SRINIVAS a S. H. KRISHNA. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology.* 2002, **20**, 433-437.
- [70] ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. a O. THUM. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chemical Society Reviews.* 2013, **42**, 6475-6490.
- [71] CRAB, W. D. a C. MITCHINSON. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *TIBTECH.* 1997, **15**, 349-352.
- [72] GOMES, I., J. GOMES a W. STEINER. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource Technology.* 2003, **90**(2), 207-214. DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00110-X. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085240300110X>
- [73] VIIKARI, L., A. KANTELINEN, J. SUNDQUIST a M. LINKO. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews.* 1994, **13**(2-3), 335-350. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00053.x. ISSN 01686445. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00053.x>
- [74] WONG, K. K., L. U. TAN a J. N. SADDLER. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 1988, **52**(3), 305-317.
- [75] CHRISTAKOPOULOS, P, P KATAPODIS, E KALOGERIS, D KEKOS, B.J MACRIS, H STAMATIS a H SKALTSA. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2003, **31**(4-5), 171-175. DOI: 10.1016/S0141-8130(02)00079-X. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181300200079X>
- [76] BEG, Q. K., M. KAPOOR, L. MAHAJAN a G. S. HOONDAL. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*. 2001, **56**(3-4), 326-338. DOI: 10.1007/s002530100704. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530100704>
- [77] BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2000, **18**(5), 355-383. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00041-0. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975000000410>
- [78] BHAT, M. K. a S. BHAT. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 1997, **15**(3-4), 583-620. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975097000062>
- [79] JANG, H. D. a K. S. CHEN. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003, **19**(3), 263-268. DOI: 10.1023/A:1023641806194. ISSN 09593993. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1023641806194>
- [80] BLANCO, P., C. SIEIRO a T. G. VILLA. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, **175**(1), 1-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13595.x. ISSN 03781097. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13595.x>
- [81] GAILING, M. F., A. GUIBERT a D. COMBES. Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. *Bioprocess Engineering*. 2000, **22**(1), 69-74. DOI: 10.1007/PL00009104. ISSN 0178-515X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/PL00009104>
- [82] HOONDAL, G., TIWARI R., TIWARI R., DAHIYA N. a BEG Q. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, **59**(4-5), 409-418. DOI: 10.1007/s00253-002-1061-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-002-1061-1>
- [83] CARR, J., M. E. GURTIN a M. SLEMROD. One-dimensional structured phase transformations under prescribed loads. *Journal of Elasticity*. 1985, **15**(2), 133-142. DOI: 10.1007/BF00041988. ISSN 0374-3535. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00041988>
- [84] WILLUMSEN, P. A. a U. KARLSON. Screening of bacteria, isolated from PAHcontaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 1996, **7**(5), 415-423. DOI: 10.1007/BF00056425. ISBN 10.1007/BF00056425. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00056425>
- [85] SEN, R. Biosurfactants. Austin, Tex.: Landes Bioscience, 2010, 358 s. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 672. ISBN 14-419-5978-5.
- [86] EBNESAJJAD, S. Surface Tension and Its Measurement. *Surface Treatment of Materials for Adhesion Bonding*. Elsevier, 2006, 9-28. DOI: 10.1016/B978-081551523-4.50004-3. ISBN 9780815515234. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815515234500043>

- [87] COOPER, D. G. Biosurfactants. *Microbiological Sciences*. 1986, 3(5), 145-149.
- [88] MSARAH, M., I. IBRAHIM a W. S. AQMA. *Enzyme activity screening of thermophilic bacteria isolated from Dusun Tua Hot Spring, Malaysia*. 2018, 1-5. DOI: 10.1063/1.5027985. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5027985>
- [89] NITSCHKE, M. a S.G.V.A.O. COSTA. *Biosurfactants in food industry*. 2007, **18**(5), 252-259. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.01.002. ISSN 09242244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407000362>
- [90] MNIF, S., M. CHAMKHA, M. LABAT a S. SAYADI. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, **111**(3), 525-536. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05071.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.05071.x>
- [91] BHALLA, A., K. M. BISCHOFF a R. K. SANI. Highly Thermostable Xylanase Production from A Thermophilic *Geobacillus* sp. Strain WSUCF1 Utilizing Lignocellulosic Biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015, **3**. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00084. ISSN 2296-4185. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00084/abstract>
- [92] ABOL FOTOUH, D. M., R. A. BAYOUMI a M. A. HASSAN. Production of Thermoalkaliphilic Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and Application in Leather Industry. *Enzyme Research*. 2016, **2016**, 1-9. DOI: 10.1155/2016/9034364. ISSN 2090-0406. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/er/2016/9034364/>
- [93] MEHTA, R., V. KUMAR, H. BHUNIA a S. N. UPADHYAY. Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*. 2005, **45**(4), 325-349. DOI: 10.1080/15321790500304148. ISSN 1532-1797. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15321790500304148>
- [94] SMERILLI, M., M. NEUREITER, S. WURZ, C. HAAS, S. FRÜHAUF a W. FUCHS. *Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by Geobacillus stearothermophilus under non-sterile conditions*. 2015, **90**(4), 648-657. DOI: 10.1002/jctb.4627. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4627>
- [95] HOFVENDAHL, K. a B. HAHN-HÄGERDAL. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, **26**(2-4), 87-107. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00155-6. ISSN 01410229. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022999001556>
- [96] BAŞBÜLBÜL ÖZDEMİR, G. a H. H. BIYIK. Isolation and Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by *Geobacillus toebii* Strain HBB-247. *Indian Journal of Microbiology*. 2012, **52**(1), 104-108. DOI: 10.1007/s12088-011-0227-x. ISSN 0046-8991. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-011-0227-x>

- [97] GARG, N., W. TANG, Y. GOTO, S. K. NAIR a W. A. VAN DER DONK. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, **109**(14), 5241-5246. DOI: 10.1073/pnas.1116815109. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1116815109>
- [98] GIEDRAITYTE, G. a L. KALEDIENE. Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic *Geobacillus* sp. AY 946034 strain. *Chemija*. 2015, **26**(1), 38-45.
- [99] VIJAY, R. a K. TARIKA. Banana peel as an inexpensive carbon source for microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *International Research Journal of Environmental Sciences*. 2018, **7**(1), 1-8. ISSN 2319-1414.
- [100] GUPTA, R., Q. BEG a P. LORENZ. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, **59**(1), 15-32. DOI: 10.1007/s00253-002-0975-y. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-002-0975-y>